

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ENSAMBLAJE *IN VITRO* DE LA CÁPSIDA DEL
VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA,
Y SU INHIBICIÓN POR PÉPTIDOS DISEÑADOS
RACIONALMENTE**

Memoria presentada por
Rebeca Bocanegra Rojo
para optar al grado de Doctor en
Ciencias.
Madrid, 2011

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de
Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)
bajo la dirección del Dr. Mauricio García Mateu.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera darle las gracias a mi director de tesis, el Prof. Mauricio G. Mateu, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección. Esta tesis no ha sido un camino de rosas, gracias por tu apoyo en los momentos más desesperanzadores. Y gracias también por acuciarme (eso ha sido en todos los momentos).

Quiero expresar mi agradecimiento también al Prof. José Luis Neira, del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Sin su apoyo, tanto científico como humano, una parte importante de esta tesis no habría llegado a buen puerto. El péptido CAC1 que hemos estudiado en colaboración con el Dr. Neira y su grupo en una parte de este trabajo fue diseñado por él, y varios experimentos de caracterización estructural fueron asimismo realizados por el Dr. Neira en colaboración con nosotros y complementan nuestros propios estudios. Quiero agradecer también de modo especial la acogida en su laboratorio, donde llevé a cabo los experimentos de cinética rápida; durante esos días estuve allí como en mi casa.

También quiero agradecer al Prof. Germán Rivas, del Centro de Investigaciones Biológicas, y a la gente de su grupo (Mercedes, Carlos, Rubén, Noelia), que me acogieron en mis visitas a su laboratorio como a una más. Los experimentos de ultracentrifugación analítica en los que participé se realizaron con su supervisión y ayuda técnica y científica. Gracias a todos.

Gracias también al Dr. Miguel Ángel Martínez y a la Dra. María Nevot, de la Fundación IrsiCaixa, por su apoyo técnico y científico, también son parte integrante de esta tesis. Los experimentos de inhibición de infectividad fueron realizados por la Dra. Nevot en colaboración con nosotros.

Gracias a mis compañeros del 205 (antes 118). En lo profesional tengo que agradecer encarecidamente su ayuda a los dos técnicos del laboratorio, los licenciados Alicia Rodríguez y Miguel Ángel Fuertes, que cada uno en una línea me han apoyado a lo largo de esta tesis y la han hecho más completa. Ellos me ayudaron mucho en la realización de diferentes purificaciones y ensayos que realizamos en colaboración. También a la Dra. Inmaculada López que realizó en colaboración conmigo los experimentos de transporte de péptidos a células y fue de gran ayuda. La Dra. Marta del Álamo realizó con anterioridad en nuestro laboratorio experimentos preliminares de presentación en fagos que se continuaron durante esta Tesis.

En lo personal os tengo que dar las gracias a todos los del laboratorio. En estos cuatro años (y pico) he llegado a consideraros verdaderos amigos a muchos de vosotros. Mila y Vero, cada una en vuestro estilo habéis sido el mayor apoyo que he tenido aquí dentro, muchas gracias a las dos. Gracias también a Rebeca (la de Valladolid), con la que tengo a la vez tanto y tan poco en común y a Pablo (el niño nuevo), fuente inagotable de risas de la generación de *Los Mundos de Yupi*.

A toda la gente del resto del CBM que me ha ayudado a lo largo de estos años, con material, consejos, cañas... A “los de Esteban” y “los de Luis”; Ana, Celia, Tania, Veros, Mar... seguro que me olvido de muchos, gracias a todos; siempre me habéis ofrecido ayuda personal y material, amén de unas risas dentro o fuera de estas paredes. A las chicas del 204, gracias por todo el material (¡sobre todo por la centrífuga!). Al personal de Microscopía Óptica, siempre dispuestos a echar una mano con una sonrisa y paciencia infinita. Al de Cocinas y de Cultivos, tan diligentes, especialmente Mercedes Dávila, gracias por tus consejos, ya se sabe que la experiencia es un grado. Al servicio de Informática y sobre todo a Carlitos, ¡cuánto te echamos de menos! Y en general a todos los que me habéis ayudado, sois muchísimos y es imposible mencionaros a todos. Ojalá en todos los sitios en los que trabaje pueda encontrar un ambiente la mitad de bueno que en el CBM, así da gusto venir a trabajar.

Debo hacer mención especial a esos compañeros que he ido encontrando y que me han seguido acompañando aún cuando nuestros caminos profesionales se han separado. Juande y Yago, mis chicos de Bioquímica, gracias por enriquecer mi vida con otros puntos de vista. A los chicos de Majadahonda, creo que no se puede tener mejores compañeros, menos mal que estabais vosotros allí... Vane, gracias por ser tan tú, y por sacarnos de la espiral de *frikismo* en la que a veces nos enredamos. Esther, qué te voy a decir, creo que eres la persona que mejor puede entenderme en casi todo, gracias por estar ahí.

Por supuesto gracias a mis amigos “de fuera”, los más íntimos. Los antiguos (Isa, espero que nos queden por delante otros veinte años de amistad) y los más nuevos, que en realidad ya son viejos amigos. Mi caravana de mujeres ha sido un apoyo constante que espero no perder nunca (Montse, Pa, Lupe, ¿qué haría yo sin vosotras?); los chicos, que algunos empezasteis siendo allegados y ahora sois imprescindibles; Javi, Ferchu, Alberto, mi vida no sería lo mismo si alguno de vosotros no hubiera estado ahí en el momento adecuado. Gracias a todos por darme ánimos en los malos momentos, por arrastrarme fuera de casa cuando tocaba y por entenderme y quererme como soy.

Gracias a mi muy extensa familia. Poca gente tiene una familia como la mía y todos sin excepción me habéis apoyado en esta elección de carrera y de vida, aunque la mayoría no os terminéis de enterar de cuál es mi trabajo. El cariño que me habéis dado y me dais todos (los que seguís aquí y los que ya no están) es lo que me ha hecho

levantarme por las mañanas (y mira que me cuesta madrugar). Os quiero a todos. Especialmente quiero agradecer a mi madre y Jesús que me habéis acompañado tanto y apoyado en todo momento y en todas las decisiones; y a mis hermanas, Diana y Bárbara, con las que he discutido tanto (ahora menos, desde que me fui de casa) y a la nueva adquisición, África, que siempre me hace reír. También me gustaría mencionar especialmente a una persona sin la que hoy no estaría aquí, él despertó en mí la curiosidad por la ciencia, mi primer profesor, mi abuelo Crisanto.

A David. Sin ti no habría hecho la mitad de lo que he hecho, he tirado la toalla montones de veces y la has recogido y me la has devuelto. Gracias a ti, David, que te has leído esto sin entenderlo, que me escuchas siempre, que me has hecho un huequito. Te quiero millones.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Morfogénesis del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1)	9
2. Organización de la cápsida inmadura de VIH-1	10
3. Organización de la cápsida madura de VIH-1	12
3.1. Interfase de dimerización CTD-CTD	14
3.2. Interfase de hexamerización NTD-NTD	16
3.3. Interfase de heterodimerización CTD-NTD	17
3.4. Interfase de interacción entre hexámeros de CA alrededor de los ejes de simetría ternaria	18
3.5. Estabilidad de la cápsida madura de VIH-1	19
4. Plasticidad conformacional de CA y de la cápsida de VIH-1	20
4.1. Cambios conformacionales en NTD	20
4.2. Cambios conformacionales en CTD	20
5. Intercambio de dominios en CTD de VIH-1	21
6. Inhibición del ensamblaje de la cápsida de VIH-1	24
6.1. Inhibidores del ensamblaje de CA de tipo peptídico	25
6.2. Inhibidores del ensamblaje de CA de tipo no peptídico	26
6.3. Otros compuestos que se unen a CA de VIH-1	27
7. Aglomeración macromolecular (<i>macromolecular crowding</i>) y su efecto sobre el ensamblaje de la cápsida de VIH-1	27
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Plásmidos y fagémidos recombinantes	37

2. Péptidos sintéticos	40
3. Material biológico y su manipulación	41
3.1. Bacterias	41
3.2. Células de mamífero y su cultivo.	42
4. Mutagénesis	42
4.1. Mutagénesis dirigida	42
4.2. Mutagénesis combinatorial	43
5. Técnicas de cribado y selección de péptidos y proteínas variantes	44
5.1. Presentación en fagos (<i>Phage Display</i>)	44
5.1.1. Presentación en fagos de variantes del dominio CTD	44
5.1.2. Presentación en fagos de péptidos CAI o CAC1 variantes	46
5.1.3. Selección de fagos que presentan CTD o péptidos variantes de mayor afinidad por CA _{wt}	47
5.2. Cribado de colonias bacterianas que expresan CTD variantes	49
6. Expresión y purificación de proteínas	50
6.1. Expresión y purificación de CA _{wt} , CA-W184A/M185A y CA _{FLAG}	50
6.2. Expresión y purificación del dominio NTD aislado	51
6.3. Expresión y purificación del dominio CTD aislado sin mutar y mutante CTD-19b	51
6.4. Expresión y purificación del dominio CTD-Δ177 aislado y mutantes puntuales derivados del mismo	53
6.5. Determinación de la pureza y concentración de proteína	53
7. Ensayos de ensamblaje <i>in vitro</i> de la cápsida de VIH-1 y su inhibición por diferentes compuestos	54
7.1. Ensamblaje en solución diluida	54
7.2. Ensamblaje en presencia de agentes de aglomeración molecular	55
7.3. Ensayos de inhibición del ensamblaje <i>in vitro</i> de cápsidas de VIH-1	55
7.4. Análisis de las cinéticas de polimerización	55
8. Estudios cinéticos de asociación y disociación de CTD	56
8.1. Disociación del dímero de CTD	56
8.2. Dimerización de CTD	57
8.3. Cálculo de la constante de equilibrio de dimerización CTD-CTD.	58

9. Determinación de constantes de afinidad mediante cromatografía analítica de filtración en gel	58
10. Espectroscopía de fluorescencia	60
11. Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)	61
11.1. Análisis del equilibrio de desnaturalización seguido mediante DC	61
12. Ultracentrifugación analítica	64
12.1. Velocidad de sedimentación	64
12.2. Equilibrio de sedimentación en solución diluida	65
12.3. Equilibrio de sedimentación en presencia de agentes de aglomeración molecular.	66
13. Transporte de péptidos al interior de células	67
14. Inhibición de la infección de células en cultivo por VIH-1	68

RESULTADOS	71
-------------------	-----------

1. Efecto de la aglomeración molecular y otros factores en la hexamerización de CA durante el ensamblaje <i>in vitro</i> de la cápsida madura de VIH-1	71
1.1. Efecto de la aglomeración molecular sobre la hexamerización del dominio NTD aislado	72
1.2. Efecto de la aglomeración molecular sobre la hexamerización de CA completa con la interfase de dimerización inactivada	76
2. Efecto de la aglomeración molecular en la inhibición del ensamblaje <i>in vitro</i> de la cápsida madura de VIH-1 por moléculas pequeñas	79
3. Diseño racional y caracterización de compuestos peptídicos y no peptídicos como inhibidores del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1	83
3.1. Inhibición por dendrímeros orgánicos del ensamblaje <i>in vitro</i> de la cápsida madura de VIH-1	84
3.2. Inhibición por el péptido CAC1 (hélice 9 de CA) del ensamblaje <i>in vitro</i> de la cápsida madura de VIH-1	86
3.3. Modificación racional del péptido CAC1 para reducir su tamaño sin eliminar su actividad inhibidora sobre el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1	89

3.4. Modificación racional del péptido CAC1 para incrementar la solubilidad y actividad inhibitoria del ensamblaje <i>in vitro</i> de la cápsida madura de VIH-1	91
3.5. Diseño de péptidos que reproducen la secuencia de hélices de CA implicadas en interfases NTD-NTD o NTD-CTD durante el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1	94
3.6. Inhibición del ensamblaje <i>in vitro</i> de la cápsida madura de VIH-1 por mezclas de péptidos	95
3.7. Inhibición por péptidos de la infectividad de VIH-1 en células en cultivo	97
4. Evaluación de aproximaciones combinatoriales al reconocimiento molecular en las interfases CTD-CTD de la cápsida madura de VIH-1	100
4.1. Intentos de selección mediante presentación en fagos de péptidos combinatoriales derivados de CAC1 o CAI con mayor afinidad por CA	101
4.2. Combinatorialización del dominio CTD y selección o cribado de variantes	104
4.3. Caracterización del mutante CTD-19b obtenido a partir de una biblioteca combinatorial semi-razional mediante cribado de colonias	113
5. Estudio biofísico y bioquímico de la reacción de dimerización alternativa de CTD (mutante $\Delta 177$) mediante intercambio de dominios	116
5.1. Estudio espectroscópico del monómero y el dímero de CTD- $\Delta 177$ y análisis termodinámico de la reacción de plegamiento del monómero	117
5.2. Estudio termodinámico y cinético de la reacción de dimerización de CTD- $\Delta 177$ mediante intercambio de dominios	121
5.3. Estudio mutacional de los determinantes moleculares de la dimerización de CTD- $\Delta 177$ mediante intercambio de dominios	129
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>139</u>
1. La hexamerización de CA depende críticamente de un reordenamiento conformacional que ocurre durante la homodimerización de su dominio C-terminal	139

2. La acción de inhibidores del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 se reduce en condiciones de aglomeración macromolecular similares a las fisiológicas	142
3. Péptidos interfásicos diseñados de modo racional actúan <i>in vitro</i> como inhibidores del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1, y presentan actividad antiviral	145
3.1. El péptido CAC1 como un inhibidor eficaz del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1	145
3.2. Péptidos derivados de CAC1	147
3.3. Péptido H8	147
3.4. Mezclas de péptidos inhibidores	147
3.5. Actividad antiviral de los péptidos interfásicos	149
4. Diferentes soluciones estructurales en la interfase de dimerización entre subunidades de la cápsida de VIH-1 permiten mantener la afinidad del reconocimiento molecular	150
5. La máxima conservación de residuos en la región MHR correlaciona con su importancia para la estabilidad conformacional del monómero de CTD-Δ177, pero no para su dimerización mediante intercambio de dominios	153
5.1. Características termodinámicas y cinéticas de la reacción de dimerización de CTD-Δ177 mediante intercambio de dominios	153
5.2. Análisis del papel en el plegamiento y dimerización de CTD-Δ177 de los residuos que participan en la interfase de intercambio de dominios por péptidos interfásicos	156
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFÍA	165

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
CA	Proteína de la cápsida de VIH
CAC1	Péptido mimético de la hélice α 9 de CA
CAC1C/CAC1M	Péptidos derivados de CAC1
CAI	Péptido inhibidor del ensamblaje de VIH-1
CAP-1	Inhibidor orgánico del ensamblaje de VIH-1
CTD	Dominio C-terminal de CA
CypA	Ciclofilina A
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride
DC	Dicroísmo circular
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleósido
DO	Densidad óptica
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EM	Microscopía electrónica
ET	Tomografía electrónica
Env	Proteína de la envuelta de VIH
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gag	Poliproteína estructural mayoritaria de VIH
GdmHCl	Hidrocloreto de guanidinio
GST	Glutathione S-transferase
H8	Péptido mimético de la hélice α 8 de CA
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
K_{as}	Constante de equilibrio de asociación
k_{as}	Constante de velocidad de asociación
K_{dis}	Constante de equilibrio de disociación
k_{dis}	Constante de velocidad de disociación
MA	Proteína de la matriz de VIH-1
MHR	Región principal de homología de la proteína CA
MLV	Virus de la leucemia de Moloney
M	Masa molecular
NC	Proteína de la nucleocápsida de VIH-1
NTD	Dominio N-terminal de CA
NYAD-1	Péptido inhibidor del ensamblaje de VIH, derivado de CAI
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rho	Rodamina
RMN	Resonancia magnética nuclear
RT	Transcriptasa inversa de VIH-1
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico

TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TS	Tampón Tris-HCl-salino
UV	Ultravioleta
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo I
wt	Tipo Silvestre (no mutado)

SUMMARY

SUMMARY

Morphogenesis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) involves two stages. The first stage leads to the formation of an immature, non-infectious viral particle that contains a spherical capsid made of multiple copies of the Gag polyprotein, which includes the capsid protein CA. The interfaces between Gag subunits are still not well defined. Recently, a mutated form of the C-terminal domain (CTD) of CA has been shown to form in solution a domain-swapped dimer. The domain-swapped interface involves the highly conserved and functionally important MHR sequence, and has been proposed to have a role during immature capsid assembly. The second stage of HIV-1 morphogenesis involves a dramatic structural rearrangement of the immature viral particle to yield a mature, infectious virion. During HIV-1 maturation CA is released as an independent protein composed of two domains, the N-terminal domain (NTD) and the CTD. In the maturing virion, CA self-assembles to form a truncated cone-shaped capsid. Assembly of the mature HIV-1 capsid involves several well-defined, discrete intersubunit interfaces in which one or both CA domains participate. NTD-NTD and NTD-CTD interfaces are involved in the formation of CA hexamers, and CTD-CTD interfaces are involved in joining each hexamer to its neighbors through homodimerization. All of these interfaces are being structurally and functionally studied in detail and constitute attractive targets for the design of assembly inhibitors acting as new anti-HIV-1 agents. In the last few years, a few organic compounds and peptides identified by screening or combinatorial approaches have been shown to inhibit HIV-1 capsid assembly; some of those compounds showed also antiviral activity in HIV-1-infected cells.

The present work has focused on two related goals: first, to provide further insights into oligomerization interfaces involved in HIV-1 capsid assembly; second, to develop a novel approach for inhibition of HIV-1 capsid assembly based on the rational design of peptides aimed at mimicking different structural elements (helices) involved in distinct oligomerization interfaces in the mature HIV-1 capsid; these peptides would act as interfacial inhibitors by binding the interfaces and sterically blocking the interactions between CA subunits.

In the first part of this study we have explored the conditions needed for hexamerization of CA, focusing on the effect of macromolecular crowding on the oligomerization *versus* polymerization of this protein. Our results revealed that, contrary to polymerization of intact CA, hexamerization of CA with an inactivated CTD-CTD interface cannot be promoted, even in a crowded medium. A conformational rearrangement of CTD that occurs only on its homodimerization through the CTD-CTD interface is needed to generate in CTD the NTD-binding epitope involved in the CTD-NTD interfaces required, (together with the NTD-NTD interfaces), for CA hexamerization and polymerization.

In the second part of this study we have explored a prediction of macromolecular crowding theory that had not been experimentally tested before. Our results revealed

that, as predicted by theory, the inhibitory activity of relatively small compounds on HIV-1 capsid assembly is reduced in the presence of inert macromolecular crowding agents, that were used to mimic *in vitro* the crowded conditions found in physiological environments, including cells and the HIV-1 virion.

In the third part of this study we have rationally designed and/or modified different interfacial peptides that represent helices 8 (peptide H8) or 9 (peptides CAC1 and its derivative CAC1M) located in the CTD domain, and respectively involved in the CTD-NTD and CTD-CTD oligomerization interfaces. These peptides were able to efficiently inhibit the *in vitro* assembly of the mature HIV-1 capsid. In addition, cocktails of interfacial peptides including CAC1, CAC1M and/or H8 abolished mature capsid assembly using lower doses of each peptide, and showed a significant antiviral activity in HIV-1-infected cells.

In the fourth part of this study, we have produced a library of combinatorial variants of the CTD domain, and showed that different structural solutions at the CTD dimerization interface allow the preservation of the dimerization affinity.

In the fifth and last part of this study, we have undertaken a biophysical and biochemical study of the domain-swapped dimer of a variant form of CTD (CTD- Δ 177). The results indicate that highly conserved residues that are part of the MHR are important for the conformational stability of the protein, but do not participate directly in domain-swapped dimerization of the CTD.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Morfogénesis del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1)

Durante el ciclo biológico del VIH-1 (Fig.1), la morfogénesis del virión tiene lugar en dos etapas claramente diferenciadas (Adamson y Jones, 2004; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2008). En la primera etapa unas 5000 copias de la poliproteína Gag se ensamblan alrededor del ARN viral, dando lugar a una cápsida esférica inmadura. La parte más externa de Gag (proteína matriz, MA) se une a la membrana plasmática y puede interactuar directamente con la proteína de la envuelta viral Env, que se encuentra parcialmente embebida en la membrana. La polimerización de Gag en contacto con la membrana celular conduce a la adquisición de una envuelta lipídica que rodea a la cápsida inmadura. El virión inmaduro formado en esta primera etapa no es infeccioso. En la segunda etapa se produce la maduración del virión. La proteasa viral procesa la poliproteína Gag, y esta acción produce el desensamblaje de la cápsida inmadura dentro del virión y la liberación en su interior de la serie de proteínas y péptidos que formaban parte de Gag (abreviadas MA, CA, SP1, NC, SP2 y p6). MA queda asociada a la membrana formando una capa interna discontinua; la proteína de la nucleocápsida (NC), queda asociada al ARN; y unas 1000 o 1500 copias de la proteína de la cápsida (CA), se autoensamblan para formar una cápsida troncocónica (Ganser, *et al.*, 1999). Esta cápsida envuelve al complejo ARN-NC, junto al que constituye el núcleo o *core* del virus. El virión maduro producido en esta segunda etapa es infeccioso.

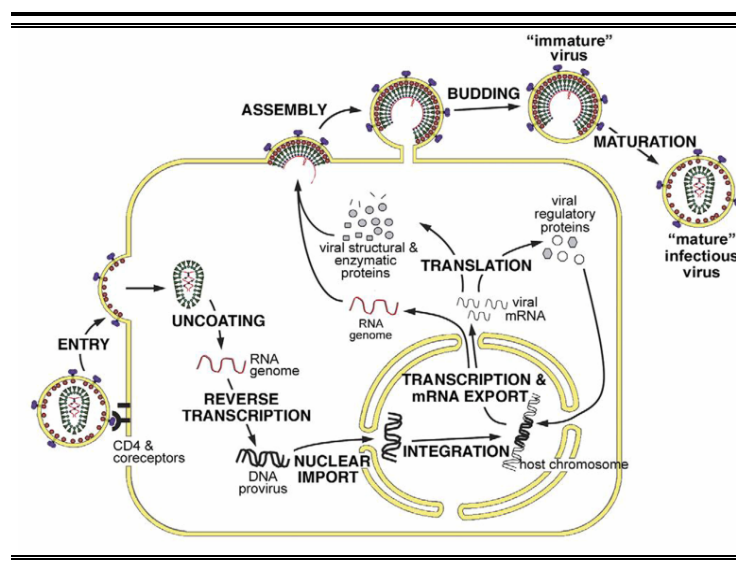
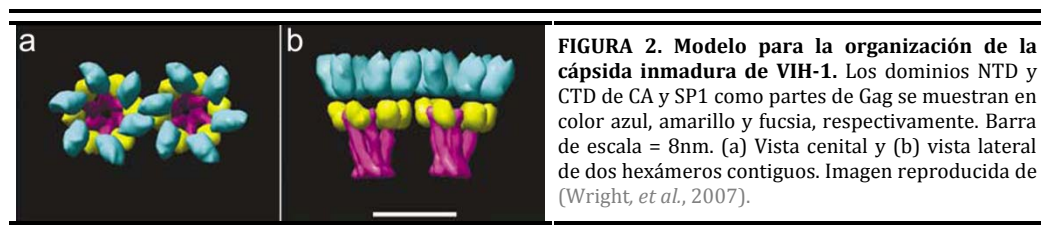


FIGURA 1. Esquema del ciclo viral del VIH-1. Se esquematizan las etapas de entrada; desensamblaje de la cápsida; transcripción inversa; integración del ADN; transcripción y traducción de las proteínas virales; ensamblaje del virión; y maduración en la partícula vírica ya liberada. Imagen reproducida de (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2008).

2. Organización de la cápsida inmadura de VIH-1

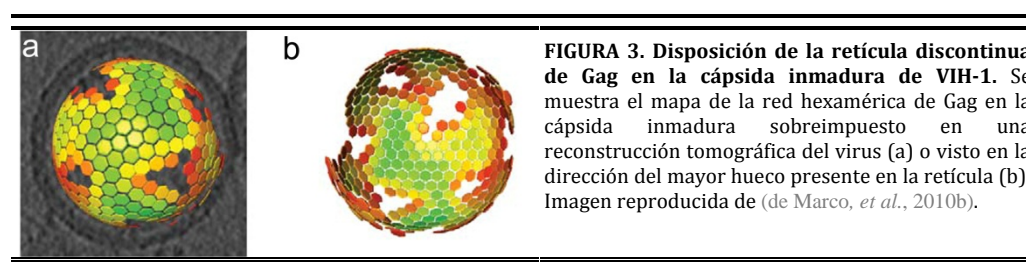
La estructura atómica de Gag aún no ha sido determinada, a pesar de que se ha podido aislar como homodímero u homotrímero en solución. Sin embargo, las estructuras atómicas de los dominios separados de Gag, tanto para VIH-1 como para otros retrovirus, han sido resueltas por cristalografía de rayos X y/o espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se han realizado además análisis estructurales de viriones y cápsidas inmaduros de VIH-1 mediante microscopía electrónica (EM) (Nermut, *et al.*, 1994), criomicroscopía electrónica (crioEM) (Fuller, *et al.*, 1997; Wilk, *et al.*, 2001) y/o criotomografía electrónica (crioET) (Carlson, *et al.*; Wright, *et al.*, 2007; Briggs, *et al.*, 2009). La superposición de las estructuras atómicas obtenidas para cada dominio de Gag en los mapas de densidad electrónica derivados de los estudios mediante técnicas microscópicas, junto a análisis mutacionales y bioquímicos, permiten afirmar que Gag adopta una disposición alargada radial en la cápsida inmadura de VIH-1, la cual queda organizada en capas homogéneas que corresponden a los diferentes dominios de Gag. El dominio N-terminal, MA permanece asociado con la parte interna de la membrana viral, y el resto de dominios forman las capas más internas según su posición en la secuencia de Gag.



La proteína CA en el contexto de Gag juega un papel decisivo en el ensamblaje de la cápsida inmadura (Dorfman, *et al.*, 1994; Mammano, *et al.*, 1994; Reicin, *et al.*, 1996; Borsetti, *et al.*, 1998; von Schwedler, *et al.*, 2003; Ako-Adjei, *et al.*, 2005). CA está formada por dos dominios, el N-terminal (NTD) y el C-terminal (CTD). Ambos son pequeños, globulares y predominantemente helicoidales. NTD contiene las hélices α 1 a 7 de CA, y está conectado por una región bisagra flexible con CTD, que contiene una pequeña hélice-3₁₀, una región extendida y las hélices α 8 a 11 de CA (Gitti, *et al.*, 1996; Momany, *et al.*, 1996; Gamble, *et al.*, 1997; Worthylake, *et al.*, 1999). En las imágenes de crioEM de la cápsida inmadura se ha observado que las moléculas de Gag interaccionan entre sí formando una red hexagonal. En esta red, la capa definida por los dominios NTD de CA adopta una disposición en anillos hexaméricos en torno a huecos relativamente grandes. Debajo de esta capa se disponen los dominios CTD de CA que se asocian en dímeros y se

ordenan en torno a huecos algo más pequeños. Más abajo aparecen estructuras alargadas que forman hexámeros y parecen corresponder a péptidos SP1. Estas estructuras descienden en la cápsida hasta llegar a la capa más interna, constituida por la nucleocápsida ARN-NC (Wright, *et al.*, 2007; Briggs, *et al.*, 2009) (Fig. 2).

A pesar de que la organización general está relativamente definida, aún no se han descrito con claridad qué regiones de Gag están implicadas en su hexamerización y en la interacción entre hexámeros vecinos. Se ha demostrado que el dominio NTD de CA es prescindible para el ensamblaje de la cápsida inmadura (Borsetti, *et al.*, 1998), pero por otro lado se ha encontrado que las mutaciones que impiden el correcto ensamblaje de la cápsida inmadura se localizan tanto en NTD como en CTD (von Schwedler, *et al.*, 2003). Este mismo análisis mutacional reveló que la interfase de dimerización CTD-CTD (fundamental para la polimerización de la cápsida madura) podría estar también implicada en la organización de la cápsida inmadura.



En resumen, con los datos de los que se dispone hasta el momento, se puede proponer el siguiente modelo para el ensamblaje de la cápsida inmadura de VIH-1 (Figs. 2 y 3) (Wright, *et al.*, 2007):

i) Los hexámeros de Gag que forman la cápsida inmadura se estabilizan, principalmente, por la formación de un haz de seis hélices α correspondientes a los segmentos SP1 de seis moléculas de Gag.

ii) Los hexámeros se mantienen unidos entre ellos a través de la homodimerización de CTD, ya sea utilizando la interfase “clásica” de homodimerización (por interacción de las hélices α 9 de cada monómero) y/o alguna otra interfase, quizá la interfase formada por intercambio de elementos estructurales (*domain swapping*) que se describe en el apartado 6 de la Introducción.

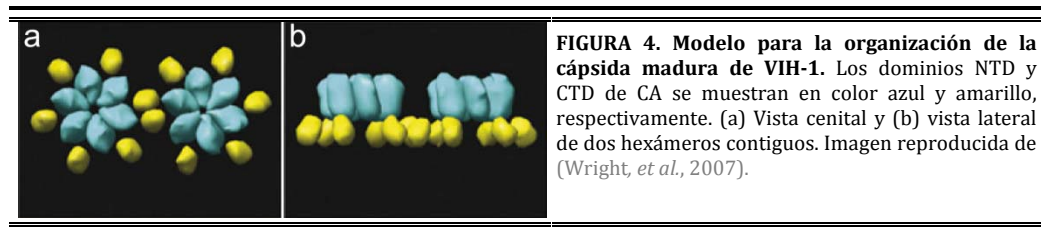
iii) Los residuos de NTD participan de algún modo en las interacciones intra o interhexámero, pero no son imprescindibles.

iv) Una red de hexámeros continua y sin defectos no podría dar lugar a una cápsida esférica. En las imágenes de crioeT se observan huecos importantes en la red de Gag en viriones inmaduros, lo que sugiere que la cápsida inmadura de VIH-1 no es una

estructura cerrada (Carlson, *et al.*; Wright, *et al.*, 2007; Briggs, *et al.*, 2009; de Marco, *et al.*, 2010b), y que la red de Gag sólo recubre aproximadamente el 60% del virión (Fig. 3).

3. Organización de la cápsida madura de VIH-1

Mediante ensamblaje *in vitro* de CA se han obtenido polímeros con la misma organización estructural que la auténtica cápsida madura de VIH-1, que se han sometido a análisis estructurales, mutacionales, y bioquímicos (Ehrlich, *et al.*, 1992; Gross, *et al.*, 1997; Ganser, *et al.*, 1999; Li, *et al.*, 2000; Ehrlich, *et al.*, 2001; Lanman, *et al.*, 2002; Lanman, *et al.*, 2003; Douglas, *et al.*, 2004; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2004; del Alamo y Mateu, 2005; del Alamo, *et al.*, 2005; Byeon, *et al.*, 2009). Un estudio de crioEM de cápsidas maduras ensambladas *in vitro* puso de manifiesto que éstas estaban formadas por una red de hexámeros de CA. Ajustando las estructuras atómicas de NTD y CTD en el mapa de densidad electrónica se vio que NTD conecta las subunidades de CA en el hexámero, mientras que CTD conecta cada hexámero con seis hexámeros adyacentes mediante homodimerización (Fig. 4) (Li, *et al.*, 2000).



Posteriormente, se utilizó un mutante de CA para obtener partículas esféricas semejantes a cápsidas, que se utilizaron para obtener un mapa tridimensional mediante criocrystalografía electrónica (Fig. 5) (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2007). El ajuste de las estructuras atómicas de CTD y NTD en este mapa permitió confirmar y refinar el modelo de la cápsida madura de VIH-1. De este modo se definieron tres interfases diferenciadas: i) interfases NTD-NTD entre dominios NTD en el anillo hexamérico; ii) interfases CTD-CTD de dimerización entre dominios CTD de hexámeros adyacentes; iii) interfases NTD-CTD entre los dominios NTD y CTD de dos monómeros adyacentes de CA dentro del mismo hexámero (Fig. 4).

Muy recientemente se ha publicado un estudio de crioEM de ensamblados tubulares de CA, que confirma las interfases descritas anteriormente y describe algunos contactos adicionales entre subunidades, establecidos entre unos pocos residuos pertenecientes a tres dímeros de CTD que corresponden a tres hexámeros adyacentes

situados alrededor de cada eje de simetría ternario en la cápsida. En este mismo estudio se confirmó la importancia de esta interfase adicional mediante análisis mutacional (Byeon, *et al.*, 2009).

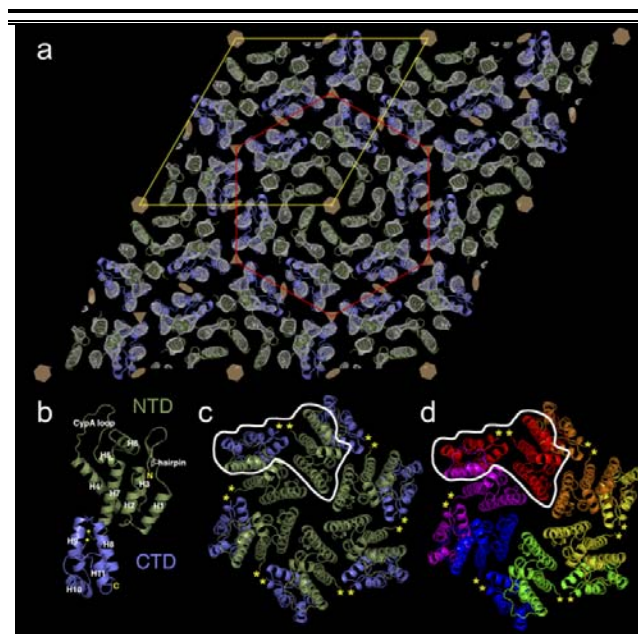


FIGURA 5. Estructura de CA y el hexámero de CA en la cápsida madura de VIH-1. (a) Mapa de densidad electrónica obtenido por criocristalografía electrónica de la cápsida madura de VIH-1. (b, c) modelos pseudoatómicos del monómero y el hexámero de CA (respectivamente), obtenidos por ajuste de las estructuras atómicas de NTD (gris) y CTD (azul) en el mapa de densidad electrónica. (c) Vista cenital del hexámero, con un monómero de CA delimitado en blanco. (d) Vista del hexámero como en (c), pero con cada monómero de CA en un color distinto. Imagen reproducida de (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2007).

La polimerización *in vitro* de CA normalmente produce estructuras cilíndricas abiertas formadas por hexámeros de CA que presentan la misma organización estructural que las cápsidas maduras auténticas. En ocasiones se observan estructuras cerradas troncocónicas semejantes a cápsidas maduras auténticas de VIH-1. A pesar de la diferencia en la forma, la organización molecular básica es la misma en los cilindros y en las estructuras cónicas (Li, *et al.*, 2000; Briggs, *et al.*, 2003; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2007). Se ha propuesto un modelo para la arquitectura de la cápsida madura troncocónica de VIH-1 que sigue los principios geométricos de estructuras de tipo fullereno: el cuerpo se compone de una red de hexámeros que se cierra incluyendo en posiciones determinadas un total de 12 pentámeros, que constituyen “defectos” de la red hexagonal (Ganser, *et al.*, 1999; Li, *et al.*, 2000). Recientemente se ha descrito la estructura cristalográfica de un mutante de CA en el que se introduce un puente disulfuro intermonomérico para estabilizar el pentámero. Las interfases presentes en el pentámero son cuasiequivalentes a las presentes en el hexámero, con cambios sutiles de orientación entre los monómeros y los dominios de CA, que permiten la diferente estequiometría. El pentámero parece tener menor estabilidad que el hexámero, debido a la posible presencia de repulsiones electrostáticas, y se postula que es el balance entre estas repulsiones y la estabilización de la cápsida lo que hace que sólo se introduzcan pentámeros en zonas muy concretas de la

cápsida para liberar la tensión producida por la curvatura de la superficie (Pornillos, *et al.*, 2011).

3.1. Interfase de dimerización CTD-CTD

Se dispone de una descripción estructural de alta definición de la interfase CTD-CTD que conecta los hexámeros adyacentes en la cápsida madura de VIH-1, obtenida mediante cristalografía de rayos X de dímeros de CTD (Gamble, *et al.*, 1997; Worthylake, *et al.*, 1999) (Fig. 6a). Esta interfase está formada esencialmente por el empaquetamiento paralelo de la hélice α 9 de cada monómero, aunque también implica interacciones entre residuos de la hélice 3₁₀ de un monómero y residuos de las hélices α 9 y 10 del otro monómero. La descripción de la estructura de esta interfase en el dominio aislado CTD es consistente con las descripciones de la interfase de dimerización CTD-CTD en la cápsida madura de VIH-1, obtenidas a partir de modelos pseudoatómicos de partículas semejantes a cápsidas (Li, *et al.*, 2000; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2007), del análisis de los efectos de mutaciones de CA sobre el ensamblaje de partículas semejantes a cápsidas o sobre la formación de auténticas cápsidas víricas (von Schwedler, *et al.*, 2003; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2004) y de experimentos de intercambio entre hidrógeno y deuterio analizado mediante espectrometría de masas (Lanman, *et al.*, 2003).

En la estructura atómica de CTD la interfase de dimerización incluye 22 aminoácidos de cada monómero, y puede implicar una superficie aproximada de 1800 Å². Aproximadamente la tercera parte de esa superficie está formada por cadenas laterales apolares (Gamble, *et al.*, 1997; Worthylake, *et al.*, 1999). El dominio aislado CTD dimeriza, esencialmente, con la misma afinidad que la proteína CA completa, y contiene todas las interacciones CTD-CTD importantes en CA (Worthylake, *et al.*, 1999). Esto ha permitido la disección termodinámica cuantitativa de esta interfase (Mateu, 2002; del Alamo, *et al.*, 2003; del Alamo y Mateu, 2005).

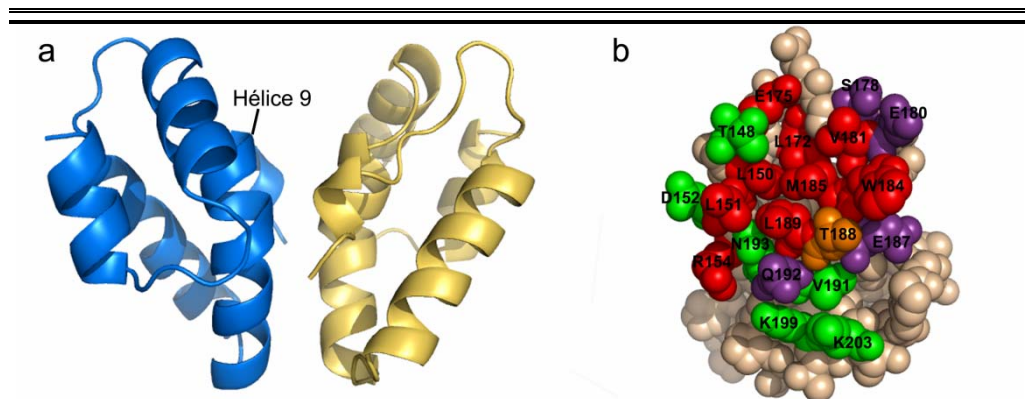


FIGURA 6. Interfase de dimerización CTD-CTD. (a) Modelo de cintas de la estructura tridimensional del dímero de CTD (Worthylake, *et al.*, 1999). Cada monómero se ha representado en un color diferente. Se ha marcado la hélice 9. (b) Modelo de Van der Waals de un monómero de CTD, orientado de forma que la interfase de dimerización queda frente al observador. Los residuos interfásicos están numerados y se representan mediante un código de colores, según el efecto de su mutación a alanina sobre el proceso de asociación. Rojo, la

eliminación de la cadena lateral hace la proteína monomérica incluso a altas concentraciones; naranja, la eliminación de la cadena lateral supone una reducción importante de la afinidad; verde, la eliminación de la cadena lateral no afecta significativamente a la asociación, o reduce ligeramente la afinidad; violeta, la eliminación de la cadena lateral produce un incremento en la afinidad (del Alamo, *et al.*, 2003).

Se determinó la contribución energética de cada cadena lateral involucrada en la interfase mediante mutación sistemática a Ala, usando cromatografía analítica de filtración en gel para determinar la constante de equilibrio de asociación para cada mutante individual. Se encontró que eliminar la cadena lateral de cada uno de la mitad de los aminoácidos implicados en la interfase (Ile150, Leu151, Leu172, Glu175, Val181, Trp184, Met185 y Leu189) desestabilizó la interacción CTD-CTD por encima de 6 kcal·mol⁻¹, siendo estos mutantes esencialmente monoméricos incluso a concentración muy elevada (del Alamo, *et al.*, 2003). La interfase de dimerización de CTD está formada por un área central de residuos críticos energéticamente, en su mayoría hidrofóbicos, rodeados de un anillo de residuos energéticamente menos importantes, de naturaleza polar (Fig. 6b).

En CTD la afinidad de dimerización es relativamente baja, comparada con otras interfases de interacción proteína-proteína de características similares. Esto es así en parte debido a la existencia de varios residuos de la interfase que contribuyen a la desestabilización del dímero (del Alamo, *et al.*, 2003). Parte de dicho efecto desestabilizador es el resultado de repulsiones electrostáticas entre los dos monómeros, entre otras la repulsión entre las cadenas laterales de Glu180 de cada subunidad, que está conservado en VIH-1 (del Alamo y Mateu, 2005). Esta repulsión parece conservarse entre diferentes variantes de VIH-1, VIH-2 o del virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), incluso a través de mutaciones compensatorias, lo que sugiere que dichas repulsiones pueden ser la consecuencia de una presión selectiva para un equilibrio óptimo entre la estabilidad de la cápsida (para mantener la integridad estructural del virión) y su inestabilidad (para permitir la liberación del ARN viral en el interior celular). Esta descripción termodinámica de la interfase de dimerización de CTD puede aplicarse a la interfase de dimerización en el contexto de la cápsida de VIH-1, dado que existe una correlación entre los efectos de las mutaciones en la dimerización de CTD y en el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 (Gamble, *et al.*, 1997; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2004; del Alamo y Mateu, 2005).

Posteriormente a estos estudios se describió la estructura de un dímero de CTD determinada mediante espectroscopía RMN, en el que la geometría de la interfase es algo distinta a la del dímero anteriormente descrito (Byeon, *et al.*, 2009). En esta estructura la interfase de dimerización implica también a la hélice α 9, que en vez de empaquetarse en paralelo en la interfase lo hace en forma de V, con un ángulo de unos 56°. Además en esta interfase se describe una importante interacción entre los residuos del N-terminal de CTD, con especial relevancia de Tyr145 (Byeon, *et al.*, 2009). Recientemente se ha propuesto un modelo para la cápsida madura de VIH-1 en el que ambos tipos de dímeros podrían coexistir. Las uniones hexámero-hexámero serían a través de dímeros “en forma de V” (Byeon, *et al.*, 2009), y las uniones entre hexámeros y pentámeros a través de dímeros “clásicos” (Gamble, *et al.*, 1997) en los que las hélices 9 de cada monómero se

empaquetan de forma paralela (Pornillos, *et al.*, 2011). La rotación de la interfase de dimerización CTD-CTD, que puede considerarse una distorsión estructural de la interfase más estable (de energía mínima) observada en el dímero de CA en solución y caracterizada termodinámicamente, podría ser un elemento de control para el correcto ensamblaje de la cápsida madura troncocónica. Esta y otras observaciones revelan una inusual flexibilidad conformacional en CTD que parece tener importantes implicaciones biológicas (ver apartado 4 de la Introducción).

3.2. Interfase de hexamerización NTD-NTD

Hasta la fecha no se ha conseguido formar hexámeros de CA de VIH-1 en solución, ni utilizando el dominio NTD aislado, ni la proteína CA entera (pero con la interfase de dimerización inactivada para evitar la polimerización de la cápsida). La capacidad de CA de VIH-1 de formar cápsidas completas *in vitro* pero no de hexamerizar en solución presenta un interrogante estructural que no había sido abordado en profundidad, y ha inhibido la realización de estudios biofísicos y bioquímicos detallados de las interfases NTD-NTD en la cápsida madura de VIH-1.

Sin embargo, y a diferencia de CA de VIH-1, en condiciones de muy elevada concentración de CA del virus de la leucemia murina (MLV) se consiguieron cristalizar hexámeros de NTD aislados de esta proteína. Esto permitió una primera descripción estructural a resolución atómica de una interfase NTD-NTD en CA de un retrovirus. (Mortuza, *et al.*, 2004). Además, las estructuras terciarias de los dominios NTD de MLV y VIH-1 son muy similares, por lo que la superposición de la estructura atómica del NTD de VIH-1 sobre el hexámero de MLV proporcionó un modelo cuasiatómico de las interacciones cuaternarias en el hexámero de CA de VIH-1 (Kelly, *et al.*, 2006). Muy recientemente, la proteína CA de VIH-1 ha sido modificada introduciendo un puente disulfuro entre monómeros del mismo hexámero (y debilitando drásticamente la interfase de dimerización mediante la mutación de los residuos 184 y 185 a Ala), lo que finalmente ha permitido obtener hexámeros en condiciones de cristalización. Mediante esta estrategia se ha conseguido por fin determinar la estructura atómica del hexámero (modificado) de CA de VIH-1 (Pornillos, *et al.*, 2009) (Fig. 7).

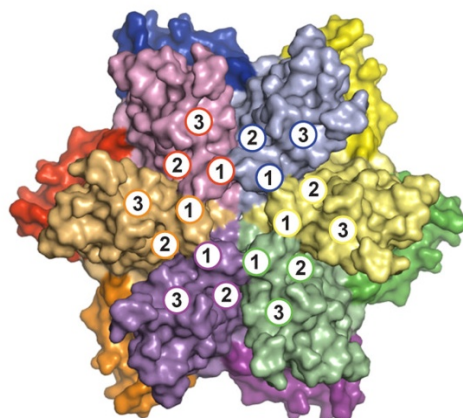


FIGURA 7. Estructura cristalográfica del hexámero de CA. Vista cenital de la estructura cristalográfica del hexámero de CA estabilizado por puentes disulfuro intercatenarios. Cada monómero de CA se muestra en un color, con los dominios NTD en un tono más apagado y los dominios CTD en uno más brillante. La posición de las tres primeras hélices α de cada monómero de CA está marcada con un círculo numerado. Esas tres primeras hélices de cada monómero forman un barril de 18 hélices en el centro del hexámero. Imagen reproducida de (Pornillos, *et al.*, 2009).

Las características de la interfase NTD-NTD implicada en la hexamerización de CA de VIH-1 obtenidas a partir de las dos aproximaciones mencionadas concuerdan bastante bien. Las hélices 1, 2 y 3 de NTD se disponen alrededor del agujero central del anillo hexamérico, formando un haz de 18 hélices α , con la hélice 1 de cada monómero formando la pared del agujero. La interfase NTD-NTD se define por los contactos entre residuos de las hélices 1 y 3 de un monómero de NTD, y residuos de las hélices 1 y 2 del monómero adyacente (Fig. 7). Estos modelos han sido validados por análisis mutacionales (von Schwedler, *et al.*, 2003; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2004) y por un estudio de intercambio entre hidrógeno y deuterio (Lanman, *et al.*, 2003).

No se dispone de estudios termodinámicos de la interfase de hexamerización a través del NTD. Sin embargo, en la estructura cristalográfica del hexámero de MLV, la interfase de hexamerización ocupa una superficie de sólo 1100 Å², y la mayoría de las interacciones implicadas son de naturaleza polar, careciendo la interfase de un núcleo hidrofóbico. Todas estas características pueden contribuir a explicar por qué el dominio NTD de CA tiene una tendencia a homo-oligomerizar tan extremadamente baja. Además, de forma similar a lo que ocurre con CTD, la energía libre de asociación de la interfase NTD-NTD también podría estar limitada por repulsiones electrostáticas entre los monómeros, debidas a la presencia de residuos cargados en NTD, aunque en este caso dichos residuos no forman parte de la interfase en sí (Douglas, *et al.*, 2004).

3.3. Interfase de heterodimerización CTD-NTD

Una serie de estudios en retrovirus sugerían que, además de las interfases CTD-CTD y NTD-NTD descritas hasta ese momento en la cápsida madura, podría existir una tercera interfase formada por heterodimerización entre CTD y NTD. Por ejemplo, esta interfase aparecía definida en un modelo pseudoatómico de partículas semejantes a cápsidas del virus del sarcoma de Rous (Cardone, *et al.*, 2009). Se sugirió que en esta interfase existirían repulsiones electrostáticas que, de forma análoga a lo que ocurre en la interfase de dimerización CTD-CTD, desestabilizarían la cápsida. Otra evidencia indirecta

de una interfase CTD-NTD en VIH-1 fue que la actividad inhibitoria de CTD aislado sobre la polimerización *in vitro* de CA se podía contrarrestar mediante la adición de NTD aislado, sugiriendo algún tipo de interacción entre ambos (Lanman, *et al.*, 2002). Además, en experimentos de entrecruzamiento y análisis de espectrometría de masas de cápsidas de VIH-1 se observaron residuos de NTD (Lys70) y CTD (Lys182) que se encontrarían espacialmente cerca en la estructura, pero que no formaban parte de las interfases descritas antes (Lanman, *et al.*, 2003). En experimentos de intercambio de hidrógeno y deuterio detectado por RMN también se determinó que en la proteína CA formando parte de la cápsida, la zona C-terminal de la hélice 3 y la N-terminal de la hélice 4 (ambas en NTD) estaban protegidas del intercambio (Lanman, *et al.*, 2003), a pesar de que estos elementos no forman parte de las interfases CTD-CTD y NTD-NTD descritas anteriormente (Li, *et al.*, 2000). Finalmente, la interfase CTD-NTD pudo ser directamente observada en modelos pseudoatómicos de la cápsida madura de VIH-1 (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2007; Pornillos, *et al.*, 2009).

La reciente determinación de la estructura del hexámero de CA de VIH-1 ha permitido un análisis más completo de las interacciones implicadas en la interfase CTD-NTD (Pornillos, *et al.*, 2009). La mayoría de esas interacciones implican a residuos de la hélice 8 en el CTD, que interaccionan con el N-terminal de la hélice 4 en el NTD del monómero de CA adyacente. Además se aprecian contactos adicionales entre la hélice 11 en el CTD y el extremo C-terminal de la hélice 7 en el NTD. Como en el caso de la interfase NTD-NTD, la interfase CTD-NTD carece de un núcleo hidrofóbico, y las interacciones son predominantemente polares, muchas de ellas mediadas por moléculas de agua, e incluyen interacciones que estabilizan hélices (*helix-capping*). Es importante resaltar que la interfase CTD-NTD implica a la región de CTD denominada MHR. El MHR es un segmento de 20 aminoácidos con un elevado grado de conservación en todos los retrovirus. Debido a esto se han realizado numerosos análisis mutacionales sobre esta secuencia concreta de CA, evidenciando su importancia para muchos de los pasos del ciclo viral de VIH-1, incluyendo el ensamblaje de la cápsida, tanto madura como inmadura (Mammano, *et al.*, 1994; von Schwedler, *et al.*, 2003).

3.4. Interfase de interacción entre hexámeros de CA alrededor de los ejes de simetría ternaria

Recientemente se ha descrito una nueva interfase de interacción en la cápsida madura de CA, localizada en cada eje de simetría ternario, el punto donde confluyen tres hexámeros de CA. Esta interfase, junto con interfase CTD-CTD (aunque muy probablemente en mucha menor medida), contribuiría a mantener unidos los hexámeros (Byeon, *et al.*, 2009). La interfase descrita por estos autores implica interacciones entre la hélice 10 de un monómero de CTD y la hélice 11 de otro monómero de CTD correspondiente a un hexámero distinto (Fig. 8).

El modelo estructural disponible no es lo suficientemente detallado para determinar exactamente los residuos implicados en esta recientemente definida interfase; sin embargo, algunos resultados bioquímicos ponen de manifiesto su relevancia. Se han identificado residuos funcionalmente importantes en las hélices 10 y 11, entre ellos Lys203 y Gln219 (Forshey, *et al.*, 2002; von Schwedler, *et al.*, 2003; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2004). Se han llevado a cabo experimentos de entrecruzamiento mediante puentes disulfuro para constatar la cercanía de los residuos afectados en la estructura en torno al eje ternario de simetría (Byeon, *et al.*, 2009). Mediante la mutación de un único residuo cargado en esta interfase (Glu213) se han obtenido cápsidas de CA de estabilidad incrementada (Byeon, *et al.*, 2009), lo que sugiere que existen interacciones repulsivas también en esta interfase.

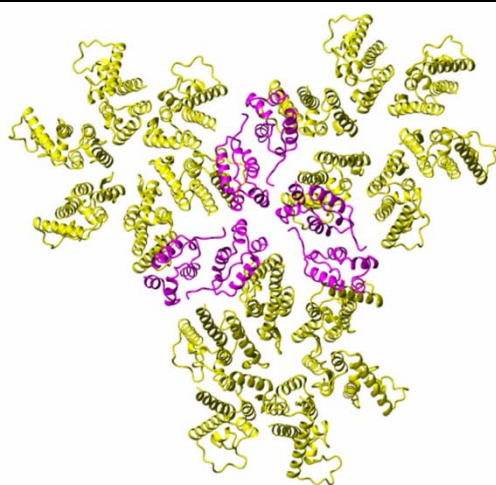


FIGURA 8. Disposición de tres hexámeros de CA alrededor de un eje de simetría terciario en la cápsida madura de VIH-1. Se muestra la estructura pseudoatómica de hexámeros de CA en la cápsida, modelada mediante el ajuste de las estructuras atómicas de NTD y CTD en el mapa de densidad electrónica. Los dominios NTD se representan en amarillo y los CTD en fucsia. En torno al eje terciario de simetría en el que confluyen tres hexámeros se produce la interacción entre tres dominios CTD. Imagen reproducida de (Byeon, *et al.*, 2009).

3.5. Estabilidad de la cápsida madura de VIH-1

La cápsida madura de VIH-1 es extraordinariamente inestable, lo que puede constituir un rasgo selectivo para permitir una fácil desencapsidación del material genético una vez liberado el *core* del virión en el citosol durante las etapas tempranas de infección. Parte de esta inestabilidad estructural puede deberse a la presencia de repulsiones electrostáticas entre subunidades de CA, cuya existencia se ha demostrado o al menos sugerido en todas las interfases presentes en la cápsida madura (Douglas, *et al.*, 2004; del Alamo y Mateu, 2005; Byeon, *et al.*, 2009; Cardone, *et al.*, 2009). La cápsida madura de VIH-1 parece, pues, haber evolucionado hasta encontrar un equilibrio delicado entre estabilidad e inestabilidad.

4. Plasticidad conformacional de CA y de la cápsida de VIH-1

Un rasgo estructural muy notable de la cápsida de VIH-1 es su plasticidad estructural. En la actualidad existen evidencias sustanciales de que se producen distintas reestructuraciones conformacionales en CA durante el ensamblaje de la cápsida inmadura y de la cápsida madura, tanto en VIH-1 como en otros retrovirus. Estos cambios conformacionales podrían explicar varias observaciones, como la capacidad que las CAs retrovirales y sus dominios independientes tienen de polimerizar en distintas condiciones; las formas diferentes de la cápsida madura e inmadura de VIH-1 (Lanman, *et al.*, 2002) y de las cápsidas maduras e inmaduras de los distintos retrovirus (de Marco, *et al.*, 2010a); la distinta organización estructural de CA en la cápsida madura y en la inmadura (incluyendo la disposición y el espaciado entre los hexámeros) (Mayo, *et al.*, 2003); la formación de hexámeros y pentámeros a partir de los mismos elementos estructurales (Cardone, *et al.*, 2009; Pornillos, *et al.*, 2011); la interacción de CA con ligandos variados y su efecto en el ensamblaje de la cápsida (Neira, 2009); y la posibilidad de que se produzcan transiciones entre interfases alternativas durante la morfogénesis de VIH-1.

4.1. Cambios conformacionales en NTD

Durante la maduración de VIH-1 se ha propuesto que el corte proteolítico entre CTD y SP1 desestabiliza la cápsida inmadura, y el corte entre MA y NTD permite el plegamiento del N-terminal de NTD en forma de horquilla β , lo que provoca un cambio conformacional local en NTD (Carlson, *et al.*; Gross, *et al.*, 2000; Wright, *et al.*, 2007; de Marco, *et al.*, 2010b). Se ha propuesto que este cambio conformacional desestabiliza la cápsida inmadura y/o permite la formación de la interfase NTD-NTD de la cápsida madura, promoviendo el ensamblaje de esta última (von Schwedler, *et al.*, 1998). La unión de ligandos al NTD también puede provocar cambios conformacionales, por ejemplo la ciclofilina-A (CypA) (Bon Homme, *et al.*, 2005).

4.2. Cambios conformacionales en CTD

Los análisis biofísicos y termodinámicos del proceso de dimerización de CTD, desde el estado desnaturalizado, revelaron la presencia de un intermediario monomérico de baja estabilidad, en el que se ha perdido parte de la estructura nativa del monómero en el contexto del dímero (Mateu, 2002; Lidon-Moya, *et al.*, 2005). Así pues, la dimerización de CTD implica una importante reestructuración conformacional de los monómeros que interaccionan. El mutante de CTD W184A no dimeriza ni siquiera a concentraciones tan elevadas como 1 mM (Gamble, *et al.*, 1997) y sus características

espectroscópicas y estabilidad conformacional indican que su estructura es muy similar a la del intermediario monomérico en CTD. Recientemente se ha demostrado directamente mediante espectroscopía RMN que la estructura terciaria de CTD W184A (y por tanto del intermediario monomérico) no es idéntica a la del monómero en el dímero. Concretamente, la hélice α 9 está estructurada sólo de forma transitoria, y las dos últimas hélices de CTD están rotadas respecto a su posición en el dímero (Alcaraz, *et al.*, 2007). Se ha resuelto además la estructura de otro mutante monomérico, CTD W184A/M185A, en el que la hélice 9 está acortada, pero formada, y las dos últimas hélices están colocadas en la misma posición que en el dímero. La diferencia entre ambos se ha atribuido a los diferentes pH a los que se hicieron los experimentos de RMN, que en el caso del W184A/M185A fue pH ácido. Efectivamente, en este mutante se pierden las resonancias correspondientes a la hélice 9 cuando el experimento de RMN se hace a pH neutro (Wong, *et al.*, 2008). Por tanto, en condiciones más aproximadas a las fisiológicas la estructura del monómero de CTD sufre un cambio conformacional importante cuando forma el dímero. El monómero libre de CTD es, de por sí, muy flexible (Alcaraz, *et al.*, 2008), lo que implica que tanto *in vitro* como durante la morfogénesis de VIH-1 *in vivo*, el balance energético entre conformaciones alternativas de CTD puede ser alterado por pequeños cambios en el entorno, mutaciones o unión de ligandos a CTD (Ehrlich, *et al.*, 2001; Mayo, *et al.*, 2003; Ternois, *et al.*, 2005). Este modelo es consistente con las distintas estructuras cristalinas obtenidas para el dímero de CTD (Worthylake, *et al.*, 1999; Byeon, *et al.*, 2009), incluyendo un dímero formado mediante la interacción a través de una interfase formada por intercambio de dominios (Ivanov, *et al.*, 2007) (ver apartado 5 de la Introducción).

En resumen, gracias a la enorme plasticidad estructural de los dominios de CA, y a que estos están unidos por un espaciador flexible, se pueden producir diversos cambios conformacionales de CA durante la morfogénesis de VIH-1, dando lugar a las distintas estructuras necesarias en cada momento del ciclo viral.

5. Intercambio de dominios en CTD de VIH-1

El proceso de intercambio de dominios (*domain swapping*) se define como aquel proceso en el que dos o más monómeros de una proteína intercambian alguna parte de su estructura para formar un oligómero (Fig. 9). En general no se intercambia un dominio estructural entero, sino únicamente algún elemento estructural, como por ejemplo una hélice. En estos oligómeros cada subunidad presenta una estructura muy similar a la del monómero aislado, exceptuando una región bisagra que conecta la parte intercambiada con el resto de la estructura, y que normalmente se encuentra plegada sobre sí misma en el monómero y extendida en el oligómero (Bennett, *et al.*, 1994; Bennett, *et al.*, 1995). Los oligómeros de dominios intercambiados se caracterizan por dos interfases: la interfase primaria es aquella en la que las interacciones son idénticas en el monómero y en el oligómero, excepto que en el primero son intramoleculares y en el segundo

intermoleculares (Fig. 9); la interfase secundaria es una nueva interfase intermolecular que se genera al polimerizar el oligómero debido a la proximidad de las subunidades (Schlunegger, *et al.*, 1997).

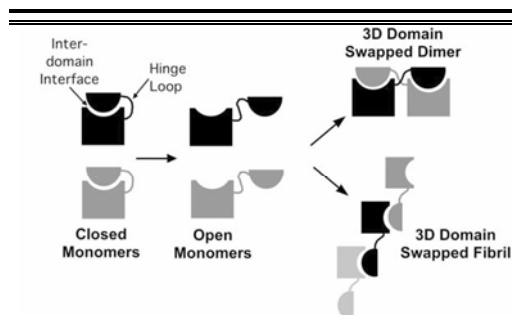


FIGURA 9. Oligomerización y polimerización mediante intercambio de dominios. Los monómeros cerrados contienen una interfase que bajo ciertas condiciones puede quedar libre al abrirse los monómeros. Los monómeros abiertos pueden unirse para dar dímeros cerrados (arriba a la derecha) o polímeros de mayor orden con los extremos abiertos (abajo a la derecha), en los que la interfase está formada por dos o más cadenas polipeptídicas independientes. Imagen reproducida de (Bennett y Eisenberg, 2004).

Se han encontrado ejemplos variados de proteínas capaces de oligomerizar por este mecanismo en distintos organismos, pero todavía no está claro cuál puede ser la relevancia biológica del intercambio de dominios. Una propuesta es que puede servir como elemento regulador de la función de la proteína. Por ejemplo, la formación de oligómeros de dominios intercambiados puede permitir una regulación alostérica de la actividad de la proteína, como se ha visto para la RNasa seminal bovina (Vitagliano, *et al.*, 1999). También se ha observado que la cápsida de un virus icosaédrico, formada por dímeros de dominios intercambiados presenta una termoestabilidad incrementada respecto a otros virus de la misma familia cuyas cápsidas no tienen este tipo de asociaciones (Qu, *et al.*, 2000). El intercambio de dominios puede también estar relacionado con mecanismos de plegamiento incorrecto de proteínas, su agregación y la formación de fibras amiloides (Schlunegger, *et al.*, 1997; Fink, 1998). Por último, también se ha propuesto que el mecanismo de intercambio de dominios podría haber contribuido a la diversificación estructural y la aparición de oligómeros durante la evolución (Schlunegger, *et al.*, 1997). El hecho de que una proteína que dimeriza de forma convencional pueda convertirse en un dímero de dominios intercambiados gracias a una única mutación puntual, indica que algunas proteínas pueden haber evolucionado por mecanismos de intercambio de dominios, aunque hoy en día no presenten ese tipo de estructura (Bennett y Eisenberg, 2004), lo que también viene apoyado por el hecho de que el intercambio de dominios puede rescatar la función de una proteína tras una mutación letal (Chirgadze, *et al.*, 2004).

Se ha determinado la constante de equilibrio de disociación (K_{dis}) para varios dímeros de dominios intercambiados, que se encuentra en el rango de micromolar a milimolar, lo que indica que son procesos con una afinidad muy baja. Sin embargo, mutaciones en la región bisagra o la interfase secundaria pueden favorecer tremendamente la forma dimérica de dominios intercambiados, llevando la K_{dis} hasta el rango nanomolar. Por ejemplo, introduciendo interacciones atractivas en la interfase secundaria se ha podido inducir la propensión al intercambio de dominios mediante estabilización del dímero correspondiente (Arndt, *et al.*, 1998; Hayes, *et al.*, 1999). El

acortamiento de la región bisagra ha permitido también favorecer la formación del dímero de dominios intercambiados, dado que la bisagra se hace demasiado corta para doblarse sobre sí misma y dar lugar al monómero cerrado (Chen, *et al.*, 1999). Alargar esta región puede hacerla más flexible y favorecer en algunos casos el intercambio de dominios.

Por lo general la interconversión entre monómero y dímero es muy lenta (puede variar entre días y meses) (Schlunegger, *et al.*, 1997; Rousseau, *et al.*, 2001). El mecanismo de formación de un oligómero de dominios intercambiados depende en gran medida del mecanismo de plegamiento de la proteína en cuestión, y del segmento que se intercambie en cada caso particular. En proteínas en las que se intercambia un dominio “verdadero” (entendiendo éste como una unidad de plegamiento más o menos independiente) el estado de transición para la interconversión podría ser una forma “abierta” de la estructura, en la que se habrán perdido muchas interacciones nativas, aunque en general se mantendría el plegamiento de los dominios intercambiables (Schlunegger, *et al.*, 1997). Sin embargo, muchas estructuras de dominios intercambiados requieren una asociación del plegamiento y la oligomerización más intrincada, ya que lo que se intercambia no es un dominio en sí, sino elementos de estructura secundaria, más o menos implicados en el núcleo hidrofóbico del monómero (Bourne, *et al.*, 1995; Khazanovich, *et al.*, 1996; Bourne, *et al.*, 2000). En tales casos, las interacciones que conectan el segmento intercambiado se forman muy pronto en la reacción de plegamiento, de forma que su ruptura para la formación del oligómero requiere una desnaturalización sustancial del monómero. Por ejemplo, en el caso de la proteína p13suc1, en el que el segmento que se intercambia es una cadena β , se ha propuesto un modelo en el que la molécula desnaturalizada puede plegarse alternativamente en forma de monómero o en forma de dímero de dominios intercambiados, así pues la interconversión ocurre a través del estado desnaturalizado, y la barrera cinética que hay entre ambos estados es consecuencia directa del acoplamiento de las dos reacciones de plegamiento en el estado desnaturalizado (Rousseau, *et al.*, 2001).

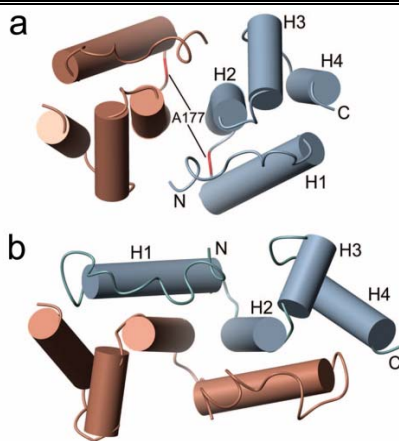


FIGURA 10. Comparación de las estructuras alternativas de dímeros de CTD en solución. (a) Dímero de CTD formado sin intercambio de dominios. (b) Dímero de CTD- $\Delta 177$ formado por intercambio de dominios. Los dos monómeros se indican en colores diferentes. La numeración de las hélices corresponde a la del dominio CTD. En la numeración correspondiente a CA, seguida en el texto de este trabajo, H1 corresponde a H8, H2 a H9, H3 a H10 y H4 a H11. Imagen reproducida de (Ivanov, *et al.*, 2007).

El dominio SCAN forma parte de muchas proteínas e interviene en la autoasociación o interacción con otras proteínas (Williams, *et al.*, 1999). SCAN aparece asociado a proteínas de vertebrados superiores que contienen dedos de zinc (Collins, *et al.*, 2001), mientras que en vertebrados inferiores aparece en poliproteínas que son reminiscentes de la estructura característica Gag-Pol presente en retrovirus y retrotransposones LTR (Sander, *et al.*, 2003). La única homología estructural significativa de SCAN que se ha encontrado en el Protein Data Bank fue con el dominio C-terminal de CA de VIH-1 y otros retrovirus (Holm y Sander, 1995). La estructura del dominio SCAN aislado de la proteína ZNF174 humana fue determinada y resultó ser un dímero de dominios intercambiados (Ivanov, *et al.*, 2005). Estas observaciones llevaron a suponer que CTD de VIH-1 podría formar un dímero alternativo con parte de su estructura intercambiada. No se ha detectado intercambio de dominios en CA de ningún retrovirus, pero esos autores realizaron una delección de un único aminoácido (Ser177) en lo que se propuso como región bisagra en CTD y obtuvieron una mezcla de dímero y monómero en solución. La determinación de la estructura cristalográfica del dímero reveló que la interfase de dimerización está formada mediante intercambio de elementos estructurales (Ivanov, *et al.*, 2007) (Fig. 10). La región que se intercambia incluye la hélice 3₁₀, la hélice 8 y el bucle entre ambas, formando el MHR una parte fundamental de esta interfase de dimerización.

Según (Ivanov, *et al.*, 2007), la dimerización de CA de VIH-1 mediante intercambio de dominios se produciría a partir de una apertura transitoria de la estructura del monómero; esta apertura estaría favorecida por el hecho de que la hélice 9 de CTD no es perfectamente regular y presenta una deformación cerca de la mitad. La tensión que esta deformación produciría en la hélice 9, junto con la rigidificación conformacional producida por la delección artificialmente introducida por estos autores (que no existe en el CTD de ningún retrovirus analizado) sería suficiente para promover la formación del dímero de CTD con “dominios” (regiones) intercambiados. Los autores de este trabajo han propuesto que esta interfase de dimerización alternativa de CTD mediante intercambio de dominios podría participar en el ensamblaje de la cápsida inmadura, ya que el MHR que forma parte de ella ha sido implicado en el proceso de morfogénesis del virión (Mammano, *et al.*, 1994; von Schwedler, *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha aportado una evidencia experimental clara ni en favor ni en contra de la participación de esta interfase alternativa CTD-CTD en el ensamblaje de la cápsida inmadura, ni se había realizado un estudio de los determinantes moleculares de la asociación CTD-CTD a través de esta interfase alternativa.

6. Inhibición del ensamblaje de la cápsida de VIH-1

En la actualidad la mayoría de los fármacos anti-VIH disponibles están dirigidos contra la transcriptasa inversa o la proteasa viral. En general, los compuestos que se usan

para el tratamiento de la infección por VIH pertenecen a uno de los siguientes tipos (De Clercq, 2002): i) inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos; ii) inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleótidos; iii) inhibidores de la proteasa viral; iv) inhibidores de la integrasa; v) inhibidores de la entrada del virus a las células. El VIH posee una elevada tasa de replicación y de mutación (Vogel, *et al.*, 2010). Estas características hacen que la emergencia de variantes del virus resistentes al tratamiento sea un problema de primer orden en la terapia anti-VIH. Actualmente en pacientes que no han sido anteriormente tratados suele comenzar el tratamiento con una combinación de dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos junto con un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleótidos, un inhibidor de la proteasa viral o un inhibidor de la integrasa (Vogel, *et al.*, 2010). El uso de terapias combinadas de varios fármacos dirigidos a distintas dianas disminuye grandemente la aparición de resistencias; sin embargo, éstas siguen produciéndose, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos inhibidores dirigidos a otras dianas.

Recientemente se está desarrollando un interés creciente por encontrar inhibidores de la infección de VIH que actúen mediante la inhibición del ensamblaje de la cápsida de este virus. Las cápsidas víricas están generalmente construidas mediante oligomerización de sólo una o unas pocas proteínas (una en el caso de VIH), lo que permite al virus utilizar un mínimo de información genética (Ispolatov, *et al.*, 2005; Levy, *et al.*, 2008). Por tanto, es en principio posible identificar o diseñar un compuesto ("inhibidor interfásico") capaz de unirse a una misma región de las interfases repetitivas en una cápsida vírica (Zutshi, *et al.*, 1998) e inhibir las interacciones entre subunidades mediante bloqueo estérico o cambio conformacional. En el caso de la cápsida madura de VIH-1, las varias interfases discretas identificadas y la detallada descripción estructural que se dispone sobre ellas (ver apartados anteriores) permite no limitarse a tratar de descubrir mediante cribado o selección a partir de quimiotecas moléculas pre-existentes que actúen como inhibidores de ensamblaje, sino también intentar el diseño de inhibidores interfásicos del ensamblaje utilizando una aproximación parcial o enteramente racional.

Hasta la fecha se han identificado mediante cribado o aproximaciones combinatoriales unos pocos inhibidores del ensamblaje de la cápsida de VIH-1, que podrían servir como base para el desarrollo de nuevos agentes anti-VIH, y que se revisan brevemente a continuación. Sin embargo, hasta la fecha no se había construido de modo racional ningún inhibidor interfásico capaz de impedir o dificultar el ensamblaje de la cápsida de VIH.

6.1. Inhibidores del ensamblaje de CA de tipo peptídico

CAI y su derivado NYAD-1. El péptido CAI (Sticht, *et al.*, 2005) fue seleccionado a partir de una librería de péptidos dodecaméricos mediante la técnica de presentación en fagos (*phage display*). Este péptido es capaz de inhibir el ensamblaje *in vitro* de CA; sin embargo, no es capaz de atravesar la membrana celular, por lo que no se había probado

su capacidad de inhibir la infección por VIH-1 en células en cultivo. Este péptido se une a CTD con una afinidad comparable a la de dimerización CTD-CTD (Sticht, *et al.*, 2005), en un bolsillo hidrofóbico del monómero de CTD formado por las hélices 8, 9 y 11 y en el que participan las cadenas laterales de V165, F168, L190, L211, L172, M215, Y169 y la parte alifática de la K182 (Ternois, *et al.*, 2005). Este sitio de unión solapa parcialmente con la interfase de heterodimerización CTD-NTD. La unión a CTD implica la estructuración de CAI en forma de hélice α , de modo que el complejo CTD-CAI está formado por un haz de cinco hélices α en vez de cuatro. La unión de CAI no impide la homodimerización de CTD, pero provoca un cambio conformacional que incluye la distorsión de la interfase de dimerización. Probablemente estos dos factores (bloqueo estérico la interfase CTD-NTD y distorsión de la interfase CTD-CTD) son los que confieren la actividad inhibitoria de CAI sobre el ensamblaje de CA.

El péptido NYAD-1 (Zhang, *et al.*, 2008) es un derivado de CAI que se obtuvo mediante una modificación racional para incrementar su propensión helicoidal. Para ello se introdujo un “puente” covalente entre dos residuos aminoácidos separados por cuatro residuos en la secuencia. NYAD-1, a diferencia de CAI, resultó ser capaz de transportarse al interior celular y fue capaz de inhibir el ensamblaje tanto de la cápsida inmadura como de la madura de VIH-1, tanto en solución *in vitro* como en células infectadas por VIH-1, así como, en alguna medida, la infección por VIH-1 en células en cultivo. NYAD-1 se une a CTD del mismo modo que lo hace CAI (Bhattacharya, *et al.*, 2008).

6.2. Inhibidores del ensamblaje de CA de tipo no peptídico

α -hidroxi-glicinamida. Se ha descrito que los tripéptidos glicil-prolil-glicinamida y alanil-leucil-glicinamida (derivados de la secuencia de CTD) en sus formas amidadas son capaces de inhibir la producción de virus en células infectadas en cultivo y los virus producidos presentan cápsidas con morfologías aberrantes (Höglund, *et al.*, 2002). En realidad, se comprobó después que estos péptidos no inhiben el ensamblaje de CA ni la infección por VIH-1, sino que son procesados en la célula dando lugar a un metabolito, α -hidroxi-glicinamida, que sí es capaz de inhibir en alguna medida el ensamblaje de CA *in vitro* y la infectividad de VIH-1 en células en cultivo (Andersson, *et al.*, 2005; Abdurahman, *et al.*, 2008).

CAP-1. Se obtuvo a partir de una quimioteca combinatorial de pequeñas moléculas orgánicas (Tang, *et al.*, 2003). CAP-1 se une a NTD de CA en un bolsillo hidrofóbico formado en la región donde convergen las hélices 1, 2, 4 y 7 (Kelly, *et al.*, 2007). La unión de CAP-1 produce un cambio conformacional en CA, lo que inhabilita a la proteína para el ensamblaje. CAP-1 es capaz de inhibir en cierta medida la infectividad de VIH-1 en células en cultivo.

PF3450074. Se obtuvo, como CAP-1, a partir de una quimioteca combinatorial de pequeñas moléculas orgánicas (Blair, *et al.*, 2010). Esta molécula se une a NTD de CA en un bolsillo formado por las hélices 3, 4, 5 y 7, y su mecanismo de inhibición de la

infectividad de VIH-1 interfiere tanto con etapas tempranas como con etapas tardías del ciclo de replicación viral. En las etapas tempranas del ciclo viral parece ser que podría producir el desensamblaje prematuro de la cápsida (Blair, *et al.*, 2010; Shi, *et al.*, 2011).

6.3. Otros compuestos que se unen a CA de VIH-1

Péptido CAC1. Basándose en los datos estructurales (Worthylake, *et al.*, 1999) y termodinámicos (del Alamo, *et al.*, 2003) disponibles, el Prof. J.L. Neira diseñó racionalmente en colaboración con nosotros un péptido de 20 aminoácidos, denominado CAC1, que reproduce la secuencia de la hélice 9 de CA y contiene gran parte de los residuos energéticamente importantes para la dimerización CTD-CTD (del Alamo, *et al.*, 2003; Garzon, *et al.*, 2004). Este péptido resultó capaz de unirse a CTD con una afinidad de dimerización que es sólo cinco veces menor que la afinidad de homodimerización CTD-CTD. Sin embargo, hasta el momento no se había probado si este péptido es capaz de inhibir el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 o la infección de células por VIH-1.

Dendrímeros orgánicos. Los denominados *dendrímeros* son compuestos orgánicos altamente ramificados, con varios grupos terminales que emergen de un solo núcleo central, y que se sintetizan en un proceso controlado en el que en cada grupo terminal se va uniendo covalentemente a los grupos funcionales que sirven como anclaje para la siguiente generación (Svenson y Tomalia, 2005; Chauhan, *et al.*, 2009). Hay estudios recientes en los que se usan dendrímeros como agentes terapéuticos poliméricos para disolver agregados proteicos y para impedir la formación de fibras de priones y de péptidos β -amiloides (Fischer, *et al.*; Svenson y Tomalia, 2005; Heegaard, *et al.*, 2007; Shcharbin, *et al.*, 2007). Muy recientemente se ha probado que diferentes compuestos dendriméricos son capaces de unirse a CTD con una afinidad similar a la de homodimerización CTD-CTD. La zona de unión de estos dendrímeros solapa con la interfase de dimerización de CTD (Domenech, *et al.*, 2010). Sin embargo, como en el caso del péptido CAC1, hasta el momento no se había probado si estos compuestos son capaces de inhibir el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 o la infección de células por VIH-1.

7. Aglomeración macromolecular (*macromolecular crowding*) y su efecto sobre el ensamblaje de la cápsida de VIH-1

Los estudios bioquímicos *in vitro* del reconocimiento molecular relacionados con el ensamblaje de la cápsida de VIH-1, y su inhibición por diferentes compuestos, se habían realizado hasta ahora en soluciones diluidas, con un bajo contenido total de macromoléculas (menos de algunos mg/ml). Sin embargo, las reacciones bioquímicas *in vivo* tienen lugar en medios que contienen concentraciones totales de macromoléculas

muy elevadas (de 50 a 400 mg/ml). Este tipo de medios no se denominan “concentrados”, puesto que no hay una sola especie macromolecular a alta concentración, sino que todas las especies juntas ocupan una fracción significativa del volumen. Por ello, este tipo de medios se conocen como “aglomerados” (*crowded*) si las especies macromoleculares están en solución, o “confinados” (*confined*) si los compuestos están estructurados (como en el citoesqueleto) (Minton, 1983; 1993; 1998; 2001; Zhou, *et al.*, 2008).

En un medio diluido, los solutos ocupan un volumen despreciable del total de la solución. Por el contrario, en un medio aglomerado (como son los fluidos fisiológicos) los solutos ocupan una fracción importante (volumen excluido) del volumen total de la solución. En general las condiciones de aglomeración macromolecular (*macromolecular crowding*) producirán un aumento de la actividad química de las especies en solución, puesto que al disminuir el volumen disponible de la solución, aumenta la “concentración efectiva” de los solutos. El incremento de actividad química para cada macrosoluto del sistema dependerá de una serie de factores, como su tamaño relativo, forma y concentración. Por ello, las características de las reacciones químicas en que estos solutos estén implicados como reactivos o productos se verán modificadas de maneras diversas en medios aglomerados, con respecto a medios diluidos.

Más en concreto, la teoría predice que la aglomeración macromolecular puede modificar considerablemente la velocidad y equilibrio de cualquier reacción macromolecular en la que haya una diferencia significativa entre el volumen excluido por los reactivos y el volumen excluido por los productos. En general las reacciones de asociación pueden estar controladas por la difusión o por el estado de transición, pudiéndose expresar la constante cinética de asociación entre dos moléculas k_A como (Zhou, *et al.*, 2008):

$$k_A = \frac{k_D k_{react}}{(k_D + k_{react})}$$

(Ecuación 1)

siendo k_D la constante cinética de asociación bajo control de la difusión y k_{react} la constante cinética de asociación bajo control del estado de transición. La aglomeración molecular afectará a estas dos constantes en distinto sentido. La k_D es proporcional a la constante de difusión de los reactivos, y en un entorno aglomerado la difusión se ve más impedida. Por otra parte la k_{react} viene dictada por la barrera energética que surge por los cambios conformacionales necesarios para la formación del estado de transición del complejo. Como el estado de transición de una reacción de asociación en solución es, generalmente, casi tan compacto como el producto, la aglomeración molecular tiende a disminuir la barrera energética y, por lo tanto, a incrementar la constante de asociación. Cuál de ambas influencias de la aglomeración molecular sea más importante dependerá de si la reacción está gobernada en mayor medida por la difusión o por el estado de transición. Típicamente las asociaciones rápidas están bajo control de la difusión, y la

aglomeración molecular tiende a decelerarlas; mientras que las asociaciones lentas están bajo control del estado de transición, y la aglomeración molecular tiende a acelerarlas (Zhou, *et al.*, 2008).

El interior celular, donde se ensambla la cápsida inmadura de VIH-1, y también el interior del virión de VIH-1, donde se ensambla la cápsida madura, constituyen medios aglomerados, donde la concentración total de macromoléculas es extremadamente elevada. Por tanto, puede ser muy importante tener en cuenta el efecto de la aglomeración macromolecular en las características de las reacciones que tienen lugar en estos compartimentos, como lo son el ensamblaje de la cápsida madura, o la capacidad inhibitoria de péptidos y otros compuestos sobre la reacción de ensamblaje.

Una de las predicciones de la teoría de aglomeración macromolecular es que procesos de polimerización (como el ensamblaje de una cápsida vírica) que estén poco favorecidos en condiciones diluidas pueden verse significativamente favorecidos en condiciones fisiológicas de aglomeración macromolecular. Hasta el momento, en nuestro conocimiento sólo existía un estudio de los efectos de aglomeración macromolecular en la morfogénesis de VIH-1 (o de cualquier otro virus), que fue realizado en nuestro laboratorio. El ensamblaje de partículas con la organización de cápsidas maduras de VIH-1, a partir de moléculas de CA en solución, sólo había sido posible *in vitro* utilizando concentraciones molares de sal para conseguir una elevadísima fuerza iónica, absolutamente no fisiológica (Lanman, *et al.*, 2002). El estudio realizado en nuestro laboratorio demostró que la adición de un agente aglomerante a baja concentración de sal, para simular condiciones cercanas a las fisiológicas en la actividad química de CA y en la fuerza iónica, fue suficiente para permitir *in vitro* el ensamblaje eficiente de partículas con la organización estructural de la cápsida madura de VIH-1 (del Alamo y Mateu, 2005). Sin embargo, en este estudio experimental inicial no se analizó el efecto de la aglomeración molecular sobre cada una de las diferentes interfases CA-CA que intervienen en el ensamblaje de la cápsida madura.

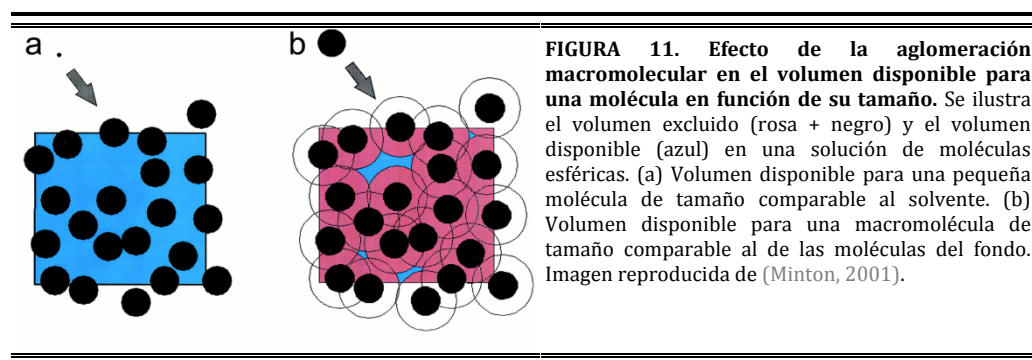


FIGURA 11. Efecto de la aglomeración macromolecular en el volumen disponible para una molécula en función de su tamaño. Se ilustra el volumen excluido (rosa + negro) y el volumen disponible (azul) en una solución de moléculas esféricas. (a) Volumen disponible para una pequeña molécula de tamaño comparable al solvente. (b) Volumen disponible para una macromolécula de tamaño comparable al de las moléculas del fondo. Imagen reproducida de (Minton, 2001).

Otra de las predicciones de la teoría de aglomeración macromolecular es que, debido a que el volumen disponible en un medio aglomerado será mucho menor para una

macromolécula que para una molécula de tamaño pequeño (Fig. 11), la actividad inhibidora de pequeñas moléculas sobre procesos de asociación macromolecular podría verse considerablemente reducida (Minton, 1993). Sin embargo, esencialmente no existían evidencias experimentales para demostrar esta predicción, y en ningún caso se había explorado su validez en un sistema de inhibición de un proceso de multimerización, como es el ensamblaje de una cápsida vírica.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Nuestro grupo está interesado en el estudio de relaciones estructura-función en el ensamblaje, estabilidad y dinámica conformacional de cápsidas víricas. Este tipo de estudios ayudan a entender aspectos básicos de etapas poco conocidas del ciclo vírico, y además suministran una base para el diseño racional de vacunas y antivirales. En nuestro laboratorio se están actualmente utilizando tres virus modelo muy diferentes, el virus de la fiebre aftosa, el virus diminuto del ratón y VIH-1, en función del aspecto concreto que deseamos analizar.

Apoyándose en resultados obtenidos previamente por diferentes grupos, incluido el nuestro, el objetivo general de esta Tesis ha sido el profundizar en diferentes aspectos relacionados con el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 y el diseño racional y análisis de compuestos capaces de inhibir este proceso.

Los objetivos concretos han sido los siguientes:

1. Estudiar si condiciones de aglomeración molecular, como las que se dan en un entorno fisiológico, y/o la presencia del dominio CTD pueden favorecer la capacidad del dominio NTD para formar hexámeros, un proceso crítico para el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1.
2. Estudiar si las condiciones de aglomeración molecular pueden reducir la capacidad inhibitoria de pequeñas moléculas sobre el ensamblaje de una cápsida vírica, y en particular sobre la formación de la cápsida madura de VIH-1.
3. Diseñar y modificar racionalmente péptidos que actúen como inhibidores interfásicos del ensamblaje de una cápsida vírica, y en particular de la cápsida madura de VIH-1, y analizar su capacidad de interferir con el ensamblaje de la cápsida *in vitro* y la infectividad del virión *ex vivo*.
4. Explorar soluciones combinatoriales para el reconocimiento entre subunidades en una cápsida vírica, en particular en la interfase CTD-CTD implicada en el ensamblaje de la cápsida de VIH-1; la información obtenida se orientaría a la modificación racional de inhibidores interfásicos (objetivo 3), para aumentar su capacidad inhibitoria o mejorar alguna de sus otras características.
5. Realizar una caracterización termodinámica y cinética y un análisis mutacional de una interfase alternativa de dimerización CTD-CTD producida mediante intercambio de dominios, y analizar el papel del MHR en la formación de esta interfase.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Plásmidos y fagémidos recombinantes

Plásmido pDAB72. Suministrado por el AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH; (Erickson-Viitanen, *et al.*, 1989). Contiene el gen correspondiente a la proteína Gag completa de la cepa BH10 de VIH-1.

Plásmido pWISP98-85. Suministrado por el AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH; (Yoo, *et al.*, 1997). Está basado en el vector de expresión pET11a y contiene la proteína CA (231 aminoácidos) de la cepa pNL4-3 de VIH-1.

Plásmido pET21b(+)*CAC*. Se obtuvo a partir de pDAB72 en nuestro laboratorio (Mateu, 2002). Está basado en el vector de expresión pET21b(+) (*Novagen*) y contiene el segmento que codifica el dominio CTD, que comprende los residuos 146 a 231 de la proteína CA de la cepa BH10 de VIH-1, flanqueado por señales de iniciación y terminación y los sitios de restricción únicos *NdeI* y *BamHI*. Confiere resistencia a ampicilina.

Plásmidos pET21b(+)*CAC*Δ177 y pWISP98-85Δ177. Contienen el gen de CTD de las cepas de VIH-1 BH10 o pNL4-3, respectivamente, en el que se introdujo la delección del residuo 177 de CA. Fueron obtenidos en nuestro laboratorio por la Dra. Inmaculada López mediante mutagénesis dirigida de los vectores pET21b(+)*CAC* o pWISP98-85, respectivamente.

Plásmidos pGEX-2T-CTDΔ177/BH10 y pGEX-2T-CTDΔ177/pNL4-3. Contienen respectivamente el gen de CTD de las cepas BH10 o pNL4-3 de VIH-1 (en el que se introdujo una mutación de delección del aminoácido 177 de CA), fusionado a la proteína GST. Fueron obtenidos en nuestro laboratorio por la Dra. Inmaculada López en colaboración con la autora de esta memoria, a partir del plásmido comercial pGEX-2T (*GE-Healthcare*).

Se utilizaron como molde los plásmidos pET21b(+)*CAC*Δ177 y pWISP98-85Δ177, respectivamente, para amplificar el segmento correspondiente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el *QuickChange Site Directed Mutagenesis kit* (*Stratagene*). La mezcla de reacción (50 μl) contenía, en el tampón de PCR apropiado, 1 μl de una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) a la concentración suministrada, 20 pmol de cada oligonucleótido iniciador, entre 60 y 70 ng del ADN del plásmido molde y 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfu. La mezcla se incubó a 94°C durante 1 min, seguido de 25 ciclos de amplificación (1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C) y de una incubación final a 72°C durante 5 min. Los oligonucleótidos usados se diseñaron para introducir las dianas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, así como un codón de terminación en el extremo de la secuencia de CTD-Δ177:

CAC-Forward:

5' TGA TAC CGC GGA TCC CCT ACC AGC ATT CTG G 3'

CAC-ReverseBH10:

5' GCG CCC GGC GAA TTC CTA CAA AAC TCT TGC CTT ATG 3'

CAC-ReversePWISP:

5' CCC GGC GAA TTC CTA CAA AAC TCT TGC TTT ATG 3'

Los segmentos amplificados y el vector pGEX-2T se digirieron con las endonucleasas de restricción BamHI y EcoRI (*New England Biolabs*). Para la digestión del vector se utilizaron 5 µg de ADN, 0,5 µl de seroalbúmina bovina (BSA), 5 µl de tampón 3(10x) (*New England Biolabs*) y 10 unidades de las enzimas BamHI y EcoRI en un volumen final de 50 µl y se incubó a 37°C durante 2 h 30 min. En el caso de los insertos el producto total de PCR se purificó con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*). El inserto así obtenido (0,5 µg en el caso de CTD-Δ177/BH10 y 0,8 µg en el caso de CTD-Δ177/pNL4.3) se digirió en las mismas condiciones que el vector. Para comprobar la linearización del vector y que los insertos tenían el tamaño adecuado una pequeña alícuota se sometió a electroforesis en gel de agarosa (*Sea Plaque GTG*) al 2% en tampón 90 mM Tris-borato sódico pH 8,0, 2 mM EDTA (TBE). Los insertos y el plásmido se purificaron directamente de la mezcla de digestión con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*). Se llevó a cabo la ligación del vector con cada uno de los insertos utilizando 100 ng del plásmido, 30 ng del inserto adecuado, 1 unidad de ADN ligasa T4 (*Roche*) y 1 µl de tampón de ligación 10x (*Roche*) en un volumen final de 10 µl. La reacción de ligación se incubó toda la noche a 16°C. Se transformaron células *E.coli* BL21(DE3) electrocompetentes con 1 µl de la mezcla de ligación y se seleccionaron colonias de bacterias recombinantes (resistentes a ampicilina). Los plásmidos recombinantes obtenidos, pGEX-2T-CTD-Δ177/BH10 y pGEX-2T-CTD-Δ177/pNL4.3, procedentes de dos colonias positivas se purificaron con el kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (*Promega*), y la secuencia completa de CTD-Δ177 en los plásmidos obtenidos fue confirmada mediante secuenciación del ADN.

Plásmido pETAflAvr. Fue obtenido en nuestro laboratorio por la Dra. Marta del Álamo a partir de pET21b(+)CAC, para tener la zona a combinatorializar entre dos dianas de restricción. Contiene el gen de la proteína CTD de BH10 clonado entre las dianas originales *NdeI* y *BamHI*, con la zona que contiene los residuos a mutagenizar (residuos 172 a 205 de CTD) flanqueada por dianas *AflIII* en 5' y *AvrII* en 3'.

Plásmido pETCOM. Fue obtenido en nuestro laboratorio por la Dra. Marta del Álamo a partir del pETAflAvr, con el objetivo de subclonar a partir de éste la CTD en el fagémido pComb3X. Se introdujo un sitio *XhoI* en 5' y un sitio *SpeI* en 3' de CTD, además se eliminaron los sitios de iniciación y terminación de CTD para poder expresarla como proteína de fusión con la proteína pIII de la superficie del fago.

Fagémido pComb3X. Cedido por el Dr. Carlos F. Barbas III (*The Scripps Research Institute*). Basado en el fagémido pComb3 (Barbas, *et al.*, 1991). El fagémido pComb3X permite el clonaje de nuestra proteína como producto de fusión con la proteína pIII de la superficie del fago. El sitio en el que se clona la proteína heteróloga (entre dianas *XhoI* y *SpeI*), va seguido de un segmento etiqueta (*tag*) His₆ de seis histidinas (que permite purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni²⁺) y un *tag* HA, que permite la detección de la proteína pIII (junto con la que lleve fusionada) utilizando un anticuerpo anti-HA; y por último la pIII del fago. Presenta resistencia a ampicilina.

Fagémido pComb3XCAC. Fue obtenido en nuestro laboratorio por la Dra. Marta del Álamo, por subclonaje del fragmento CTD del plásmido pETCOM en el fagémido pComb3X, entre dianas *XhoI* y *SpeI*, la expresión de este fagémido lleva a la producción de CTD como proteína de fusión en el N-terminal de la proteína pIII de la superficie del fago (con los *tag* His₆ y HA entre medias). Confiere resistencia a ampicilina.

Plásmido pWISBH10. Fue obtenido a partir de pDAB72 en nuestro laboratorio por la Dra. Marta del Álamo (del Álamo y Mateu, 2005). Está basado en el vector de expresión pET11a y contiene la secuencia que codifica la proteína CA de la cepa BH10 de VIH-1, flanqueada por señales de iniciación y terminación y los sitios de restricción únicos *NdeI* y *BamHI*. Confiere resistencia a ampicilina.

Plásmido pWISBH10-W184A/M185A. Se obtuvo a partir del pWISBH10 por mutagénesis dirigida. Contiene el gen de la proteína CA completa con los residuos 184 y 185 mutados alanina, lo que inhabilita la interfase de dimerización.

Plásmido pWISBH10CA_{FLAG}. Fue obtenido en nuestro laboratorio por la Lda. Alicia Rodríguez en colaboración con la autora de esta memoria, a partir del pWISBH10, clonando el *tag* FLAG (secuencia DYKDDDDK) en el N-terminal de la CA. Por PCR se amplificó la región correspondiente a CA en pWISBH10, añadiendo los sitios de restricción para subclonar el fragmento amplificado en el mismo vector, FLAG y un espaciador de tres Gly entre ambos. El fragmento amplificado se cortó con las enzimas de restricción adecuadas y se subclonó en el pWISBH10 en lugar de la CA_{wt} utilizando técnicas estándar. Los oligonucleótidos utilizados se indican a continuación. En negrita se resalta la secuencia que corresponde a la secuencia FLAG:

Forward: 5'GGAATTCCATATGG**ACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCGGAGGACCGATCGT**GCAGAACCTCCCGG3'

Reverse: 5'ACTGGATCCTTACAAAACCTCTTGCTTTATGG3'

El vector resultante se secuenció para comprobar que presentaba las secuencias correspondientes a FLAG y a la proteína CA.

Plásmido pET21b(+)_{CAN}. Fue obtenido a partir de pDAB72 en nuestro laboratorio por la Dra. Marta del Álamo. Está basado en el vector de expresión pET21b(+) (Novagen) y contiene el segmento que codifica el dominio NTD, que comprende los residuos 1 a 145 de la proteína CA de la cepa BH10 de VIH-1, obtenido del pDAB72 por PCR y clonado en pET21b(+), de forma equivalente a como se hizo con CTD, flanqueado

por señales de iniciación y terminación y los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*. Confiere resistencia a ampicilina.

2. Péptidos sintéticos

Péptido CAC1 (E¹⁷⁵QASQEVKNWMTETLLVQNA¹⁹⁴). Péptido que representa la secuencia de la hélice α 9 de CA (Garzon, *et al.*, 2004).

Péptidos CAC1C (E¹⁷⁵SASSSVKAWMTETLLVQNA¹⁹⁴) y **CAC1M** (SE¹⁷⁵SAASSVKAWMTETLLVAN¹⁹³TSS). Péptidos derivados de CAC1.

Péptidos P1 (V¹⁸¹KNWMTETLLRQ¹⁹²), **P2** (V¹⁸¹KNWMTEYLLVQ¹⁹²), **P3** (V¹⁸¹KNWMTEYLLRQ¹⁹²) y **P4** (V¹⁸¹KNWMTETLLVQ¹⁹²). Péptidos cortos derivados de CAC1.

Péptido CAI (ITFEDLLDYGP) (Sticht, *et al.*, 2005).

Péptido H2 (KAFSPEVIPMFSALESEGAT), corresponde a la secuencia de la hélice α 2 de CA.

Péptido H3 (YSALSEGATPQDLNTMLNT), corresponde a la secuencia de la hélice α 3 de CA, alargada por el N-terminal para llegar a incluir en la secuencia la F40, que se cambia por una Y para poder cuantificar su concentración.

Péptido H4 (HQAAMQMLKETINEEAAEWDRVH), corresponde a la secuencia de la hélice α 4 de CA.

Péptido H8 (KEPFRDYVDRFYKTLRAEQ), corresponde a la secuencia de la hélice α 8 de CA.

Los péptidos purificados CAC1, CAC1C, CAC1M, P1, P2, P3, P4 fueron comprados a *Genescript*, USA. El péptido purificado CAI fue comprado a *Isogen-Lifescience*. Nuevas partidas de péptidos purificados CAC1, CAC1M, CAI, y los péptidos H2, H3, H4 y H8 fueron preparados por el Servicio de Síntesis de Péptidos dirigido por el Prof. David Andreu de la Universidad Pompeu Fabra. Todos los péptidos utilizados habían sido amidados en su extremo C-terminal.

Péptidos marcados con fluoróforos. Para algunos ensayos se utilizaron algunos de los péptidos anteriores marcados con fluoróforos en su extremo N-terminal: **CAI_{FTTC}** marcado con fluoresceína fue preparado por *Isogen*; **CAI_{Rho}**, **CAC1M_{Rho}** y **H2_{Rho}** marcados con rodamina fueron preparados por el Servicio de Síntesis de la Universidad Pompeu Fabra.

3. Material biológico y su manipulación

3.1. Bacterias

XL1Blue. genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac1^qZAM15 Tn10 (Tet^R)*]. Las células termocompetentes son de la casa *Stratagene*, las electrocompetentes se prepararon en el laboratorio.

ElectroTen-Blue. cepa derivada de células XL1Blue, con las que comparte genotipo, además de mostrar deficiencias en todos los sistemas de restricción conocidos [*Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMRmrr)173*]. Las bacterias electrocompetentes se compraron a la casa *Stratagene*.

XL10Gold. genotipo Tet^R *Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R*]. Las bacterias termocompetentes son de *Stratagene*.

ER2738. genotipo F' *proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(Tet^R)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5*. Las bacterias electrocompetentes se prepararon en el laboratorio.

BL21(DE3). genotipo *E.coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)*. Las células termocompetentes y las electrocompetentes se obtuvieron del servicio de fermentación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

BL21-Gold. genotipo *E.coli B F⁻ ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet['] gal endA Hte*. Las bacterias electrocompetentes se compraron a la casa *Stratagene*.

Preparación de células XL1Blue electrocompetentes. Se siguió un protocolo ya descrito (Barbas, *et al.*, 2001). Brevemente, se crecieron 3 L de cultivo de XL1-Blue en medio de cultivo SB, 0,4% glucosa, 10 mM MgCl₂, hasta que la densidad óptica (DO) a 600 nm (DO₆₀₀) alcanzó un valor aproximado de 0,7. Se incubó el cultivo en baño de hielo 15 minutos, se sedimentaron por centrifugación las bacterias y se resuspendieron en 10% de glicerol a 4°C. Se repitió esto otras tres veces. El sedimento final se resuspendió en el sobrenadante remanente tras escurrirlo y se alicuotó y congeló en nieve carbónica, manteniéndose las alicuotas a -70°C hasta su uso.

Electroporación. Se mezclaron 50 µl de bacterias electrocompetentes con 1 µl de suspensión de ADN a la concentración adecuada (o mezcla de ligación), en cubetas de electroporación de 0,2 cm de separación entre electrodos (*BioRad*). Se realizó un único pulso de 1,5 kV, 25 µF y 200 Ω, con un electroporador *Gene Pulser (BioRad)*. Inmediatamente las células se resuspendieron en 1 ml de medio LB, se incubaron durante 1 hora a 225-250 rpm y 37°C, y se sembraron en placa de LB-agar con el antibiótico adecuado.

Transformación por choque térmico. Se mezclaron 45 µl de bacterias, a las que se habían añadido 2 µl de β-mercaptoetanol (XL10Gold) o 50 µl de bacterias (BL21(DE3)) con 1 µl de suspensión de ADN a la concentración adecuada, se incubaron 30 minutos en hielo, se sometieron a una temperatura de 42°C durante 30 segundos y se volvieron a incubar en hielo otros 2 minutos, tras lo cual se añadió 0,5 ml de medio SOC (XL10Gold) o 1 ml de medio LB (BL21(DE3)), se incubaron durante 1 hora a 225-250 rpm y 37°C, y se sembraron en placa de LB-agar con el antibiótico adecuado.

3.2. Células de mamífero y su cultivo.

NB324K. línea derivada de células de riñón humano de neonato transformadas con el virus de simio SV-40. Se usaron para poner a punto el protocolo de transfección de péptidos al interior celular. Se mantuvieron en cultivo en medio DMEM (*Gibco*) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 5%, 2 mM L-glutamina, 75 U/ml de estreptomicina y 75 µg/ml de penicilina G, a 37°C con un 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Esta línea celular fue cedida por el Prof. José María Almendral.

U87-CD4-CXCR4. línea celular de astroglioma humano que expresa receptores CD4 y CXCR4. Se usó para los ensayos de inhibición de la infección por VIH-1. Se mantuvo en cultivo en medio DMEM suplementado con SBF al 10%, 0,5 mg/ml de geneticina y 1 µg/ml de puromicina, a 37°C con un 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Esta línea celular fue cedida por el Dr. Miguel Ángel Martínez.

4. Mutagénesis

4.1. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida para obtener mutantes puntuales de alguna de las proteínas en estudio, se realizó mediante el método de PCR inversa, utilizando el *Quick Change II Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*. Para la introducción de las mutaciones se utilizaron parejas de oligonucleótidos portadores de la mutación, de longitud comprendida entre 34 y 38 nucleótidos (*Invitrogen*) (Tabla 1). Se siguieron esencialmente las instrucciones del fabricante. La presencia de las mutaciones deseadas se confirmó en todos los casos por secuenciación de fragmentos de 700 a 900 pares de bases alrededor del codón mutagenizado.

TABLA 1. Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida.

Mutación	Plásmido	Oligo	Secuencia (5'-3')
W184A/ M185A	a	184/185-F	GAGGTAAAAAATGCGGCGACAGAAACC
		184/185-R	GGTTTCTGTGCGCCGCCATTTTTTACCTC
Δ 177	b	177-F	CTAAGAGCCGAGCAATCACAGAGGAGGTAAAAAATTGG
		177-R	CCAATTTTTTACCTCCTGTGATTGCTCGGCTCTTAG
Δ 177	c	177-PWISP-F	CTAAGAGCCGAGCAATCACAAGAGGTAAAAAATTGG
		177-PWISP-R	CCAATTTTTTACCTCTTGTGATTGCTCGGCTCTTAG
R154A	d	R154A-F	GCATTCTGGACATAGCACAAGGACCAAAG
		R154A-R	CTTTGGTCCTTGTGCTATGTCCAGAATGC
Q155A	d	Q155A-F	CTGGACATAAGAGCAGGACCAAAGGAAC
		Q155A-R	GTTCCTTTGGTCCTGCTCTTATGTCCAG
F161A	d	F161A-F	CCAAAGGAACCCGCTAGAGACTATGTAG
		F161A-R	CTACATAGTCTCTAGCGGGTTCCTTTGG
Y164A	d	Y164A-F	CCCTTTAGAGACGCTGTAGACCGATTTC
		Y164A-R	GAATCGGTCTACAGCGTCTCTAAAGGG
V165A	d	V165A-F	CTTTAGAGACTATGCAGACCGATTCTATAAAAC
		V165A-R	GTTTATAGAATCGGTCTGCATAGTCTCTAAAG
F168A	d	F168A-F	CTATGTAGACCGAGCCTATAAACTCTAAG
		F168A-R	CTTAGAGTTTTATAGGCTCGGTCTACATA
M185A	d	M185A-F	GGTAAAAAATTGGGCGACAGAAACCTTGTGG
		M185A-R	CCAACAAGGTTTCTGTGCGCCAATTTTTTACC
L189A	d	L189A-F	GATGACAGAAACCGGTTGGTCCAAAATGC
		L189A-R	GCATTTTGGACCAACGCGGTTTCTGTGCATC
N193A	d	N193A-F	GTTGGTCCAAGCTGCGAAVVAGATTG
		N193A-R	CAATCTGGGTTTCGAGCTTGGACCAAC
N195A	d	N195A-F	GTCCAAAATGCGGCCCGAGATTGTAAG
		N195A-R	CTTACAATCTGGGGCCGCATTTTGGAC

^apWISBH10.^bpET21bCAC.^cpWISP98-85.^dpGEX-2T-CTD Δ 177(pNL4-3).

4.2. Mutagénesis combinatorial

Para obtener variantes de CTD con mutaciones combinatoriales en varias posiciones de la interfase de dimerización, se utilizó el *Quick Change Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*, siguiendo una variación de las instrucciones del fabricante ya descrita (Kelley y Momany, 2003). Se utilizaron oligonucleótidos con varias posiciones

mutagénicas (AflDEG y AvrDEG), en vez de un oligonucleótido por cada codón a mutagenizar, que además se unen cada uno a una hebra del ADN; se duplicó el volumen de reacción y se añadió a la reacción mutagénica 1 µl de *PfuTurbo DNA Polimerasa* (Stratagene). Se llevó a cabo la mutagénesis combinatorial tanto sobre el plásmido pETAflAvr (dando lugar al pETAflAvr_{combi}), como sobre el fagémido pComb3XCAC (dando lugar al pComb3XCAC_{combi}). Los oligonucleótidos utilizados se especifican en la Tabla 2.

TABLA 2. Oligonucleótidos utilizados para las bibliotecas combinatoriales.

Oligo	Secuencia (5'-3')
AflDEG	AACCTTAAGAGCCGAGCAAGCT NN SCAG NN SGTAAAAAATTGGATGAC NN SACCTTGTG
AvrDEG	GGTCCTAGGGCTTTTAAAAATAGTCTTACAATCTGGGTTCGC SNNSNN SNCAACAAGGT
CAC1combi	CATGTTTCGGCCGAGCCACCGCCAGACGC SNNSNN SNCAACAAGGT SNNT GTCATCCAA- TTTTTTAC SN CTG SN NAGCTTGCTCAGAGTGAGAATAGAAAGGTACCCGGG
CAIcombi	CATGTTTCGGCCGAGCCACCGCCAGACGGACCS VH SVHGTCS VH CAGGTCTTCS VH GGTS- VHAGAGTGAGAATAGAAAGGTACCCGGG

N=A/T/C/G

V=A/C/G

H=A/T/C

S=C/G

5. Técnicas de cribado y selección de péptidos y proteínas variantes

5.1. Presentación en fagos (*Phage Display*)

Las aproximaciones a la metodología de presentación en fagos se basaron en un trabajo preliminar de la Dra. Marta del Álamo en nuestro laboratorio, y se han realizado en colaboración entre la autora de esta memoria y la Lda. Alicia Rodríguez.

5.1.1. Presentación en fagos de variantes del dominio CTD

Obtención de fagos a partir de fagémidos. Los fagos se purificaron siguiendo protocolos ya descritos (Barbas, *et al.*, 2001). Brevemente, el fagémido adecuado se transformó por electroporación en *XL1-Blue* o *ElectroTen Blue*, que se crecieron en medio SB suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml y tetraciclina 0,01 mg/ml hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8. En ese momento se infectó el cultivo con 1 ml de fago *helper VCSM13*

(*Stratagene*). Este cultivo se incubó toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm, en presencia de ampicilina 0,1 mg/ml, tetraciclina 0,01 mg/ml y kanamicina 0,07 mg/ml, tras lo cual se centrifugaron las células a 5000 g en una centrífuga *Beckmann Avanti* con un rotor *JLA10500* y luego se precipitaron los fagos del sobrenadante en presencia de *PEG-8000* (*SIGMA*) 4% (w/v) y NaCl (*Merck*) 3% (w/v), que se recogieron por centrifugación a 10000 g en la misma centrífuga y rotor. Los fagos producidos se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS; 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), 1% BSA. Se utilizó este protocolo para obtener a partir de pComb3XCAC fagos que expresaran en su superficie CTD_{wt} (fago-CTD); a partir de pComb3XCAC_{combi} una biblioteca de fagos que expresaran en su superficie las variantes combinatoriales de CTD (fago-CTD_{combi}); y a partir de pComb3X fagos que no expresaran en su superficie ninguna proteína heteróloga (para utilizarlos como control negativo en los experimentos de selección).

Titulación y amplificación de fago. Para amplificar los fagos obtenidos se preparó un cultivo de *E.coli* XL1Blue o ER2738 en 50 ml de medio SB suplementado con tetraciclina a una concentración final de 0,01 mg/ml, que se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0,8. En ese momento se infectó con 10 µl de la preparación de fagos purificados y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, y se añadió ampicilina a una concentración final de 0,1 mg/ml. Para titular el fago se sembraron diluciones seriadas de esta preparación en placas LB con ampicilina. Esto da lugar al crecimiento de colonias en la placa que llevan el fagémido de interés. Para amplificar los fagos se infectó el cultivo con 2 ml de fago *helper VCSM13* (*Stratagene*), se añadió kanamicina a una concentración final de 0,07 mg/ml y se procedió a partir de aquí como en el apartado anterior.

Inmunoelectrotransferencia (Western Blot) de las proteínas del fago-CTD. Para comprobar que a partir del fagémido pComb3XCAC se obtenían fagos con la proteína CTD unida a la pIII se llevó a cabo un ensayo de inmunoelectrotransferencia, aprovechando la existencia del tag HA en la proteína de fusión. En primer lugar, se purificaron fagos-CTD como se ha explicado anteriormente. Los fagos obtenidos se aplicaron a un gel de electroforesis SDS-PAGE, y transcurrida la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa. Dicha membrana se incubó toda la noche a 4°C en una tampón 10mM TrisHCl pH7,5, 150 mM NaCl (TS) conteniendo 0,1% Tween-20, 5% leche en polvo, y después fue incubada primero con un anticuerpo anti-HA diluido 1:1000 en solución de bloqueo, y luego con una dilución 1:2000 del anticuerpo secundario *Goat-antiMouse IgH (H+L)* marcado con peroxidasa (*BioRad*) diluido 1:2000 en solución de bloqueo. Las membranas fueron reveladas utilizando el kit *Western Lightning Plus-ECL* (*Perkin Elmer*) por autorradiografía en film *Curix RP2 Plus* (*AGFA*).

Obtención de bibliotecas de fagos que presentan variantes de CTD en su superficie. Se creó una librería de mutantes combinatoriales de CTD sobre el fagémido pComb3XCAC por mutagénesis combinatorial, como se ha descrito en el apartado 4.2 de Métodos, dando lugar al fagémido pComb3XCAC_{combi}. A partir de esta biblioteca de ADN,

siguiendo el protocolo anteriormente explicado, se obtuvo una biblioteca de fagos que expresan, como proteína de fusión a pIII, mutantes combinatoriales de CTD.

5.1.2. Presentación en fagos de péptidos CAI o CAC1 variantes

Construcción de fagos que expresan los péptidos de interés en su superficie.

Se utilizó el kit *Ph.D.TM Peptide Display Cloning System* de *New England Biolabs*, para producir los fagos que expresaran en su superficie el péptido CAC1_{wt}, el péptido CAI_{wt} y las bibliotecas de fagos con variantes combinatoriales de ambos péptidos, siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. En este kit se utiliza un vector de presentación en fagos del tipo 3 (Barbas, *et al.*, 2001), de modo que los fagos producidos presentan el péptido de interés fusionado a las 5 copias de su proteína pIII. Brevemente, se diseñó un oligo adecuado con las posiciones deseadas combinatorializadas, que se anilla con el *extension primer* del kit y se trata con fragmento *Klenow* (*Invitrogen*) para obtener un inserto que se clona en el vector *M13KE* entre dianas *EagI* y *Acc65I*.

Biblioteca basada en CAC1. Se introdujeron combinatorializaciones en aquellas posiciones cuya mutación dirigida a alanina o bien no tenía efecto o bien aumentaba la afinidad de la dimerización en el dominio CTD completo (del Alamo, *et al.*, 2003). La combinatorialización fue del tipo NNS (N=A/T/G/C; S=G/C), con este tipo de combinatorialización se consigue que estén representados codones para los veinte aminoácidos que están presentes en las proteínas. El oligonucleótido usado (CAC1_{combi}) se especifica en la Tabla 2.

Biblioteca basada en CAI. Se introdujeron combinatorializaciones en aquellos residuos de CAI que interactúan directamente con CTD según la estructura cristalográfica del complejo (Ternois, *et al.*, 2005). La combinatorialización no fue completa, sino del tipo DBS (D=A/G/T; B=C/G/T; S=G/C), que favorece los residuos hidrofóbicos, puesto que buscamos aumentar la afinidad del péptido por el bolsillo hidrofóbico de CTD al que se une. El oligonucleótido usado (CAI_{combi}) se especifica en la Tabla 2 (en la tabla las posiciones combinatorializadas del oligo CAI_{combi} aparecen como HVS por ser ésta la secuencia complementaria de DBS).

Producción, titulación y amplificación de fagos. Para producir los fagos se transformaron los vectores preparados en el punto anterior en células *E.coli* XL1-Blue, ElectroTen Blue o ER2738. Tras la electroporación se añadió 1 ml de medio LB y se incubaron durante 45 minutos a 37°C con agitación a 250 rpm, tras lo cual se añadió este cultivo a 200 ml de ER2738 o XL1Blue en fase de crecimiento logarítmico en LB suplementado con tetraciclina 0,01 mg/ml. Tras incubar este cultivo durante 4 h a 37°C con agitación a 250 rpm se centrifugó a 3500 g durante 20 minutos a 4°C en centrífuga *Beckmann Avanti* con un rotor *JLA10500*, para eliminar las bacterias. Los fagos se precipitaron toda la noche con *PEG-8000* (*Sigma*) 4% (w/v) y NaCl (*Merck*) 3% (w/v) a 4°C, se recogieron por centrifugación a 5000 g durante 20 minutos a 4°C en la misma centrífuga y rotor, se resuspendieron en tampón TS y se repitió el paso de precipitación

en PEG-8000 4%/ NaCl 3% durante 1h a 4°C y centrifugación. El sedimento de esta última centrifugación, que contiene los fagos purificados, se resuspendió en tampón TS y se guardó a 4°C.

Para amplificar los fagos purificados se procedió a infectar con una solución de fagos directamente un cultivo de ER2738 o XL1Blue en fase de crecimiento logarítmico y se procedió como se indica en el apartado 5.1.1 de Métodos.

Para titular los fagos se mezclaron 10 µl de diluciones seriadas de fagos purificados (o de bacterias recién transformadas con los vectores preparados como se ha indicado arriba) con 200 µl de un cultivo en fase de crecimiento exponencial de ER2738 o XL1Blue y 3 ml de Top-Agar, y se extendió esta mezcla sobre placas LB-agar impregnadas de IPTG y X-gal, que se mantuvieron a 37°C ON. Este procedimiento da lugar a un césped de bacterias en el que se forman halos de lisis de color azul, correspondientes a los fagos producidos.

5.1.3. Selección de fagos que presentan CTD o péptidos variantes de mayor afinidad por CA_{wt}

La selección (*panning*) se hizo utilizando CA o CTD sin mutaciones, acopladas a distintos soportes:

Selección utilizando bolitas magnéticas. Se utilizó tanto para la selección de fagos-CTD como para la selección de fagos que expresaban péptidos heterólogos en su superficie. CA fue acoplada a *Dynabeads M-280 Tosyl-activated* de *Invitrogen*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron las bolitas magnéticas con la cantidad adecuada de CA en 1 ml de tampón 0,1 M borato sódico, pH 9,0 a 37°C durante 24h; se lavaron con PBS y se bloquearon los sitios no ocupados por CA incubando 16h a temperatura ambiente en un tampón 0,2 M TrisHCl pH 8,5, 0,1% (w/v) BSA; por último se lavaron con PBS y se guardaron a 4°C hasta su uso. La selección se realizó en tres rondas, siguiendo esencialmente un protocolo ya publicado (Sticht, *et al.*, 2005). Básicamente, se incubó 1 ml de la suspensión de fagos (ya sea los que expresan variantes de péptido o de proteína CTD en su superficie) con 250 µl de las bolitas magnéticas acopladas a CA ($2 \cdot 10^9$ bolitas/ml). Se retiró el medio y se hicieron cinco lavados con 1 ml de tampón TS conteniendo 0,1% Tween-20. Para eluir los fagos que han quedado pegados a la CA se utilizaron 50 µl de un tampón 0,2 M glicina pH 2,2, 1 mg/ml BSA. Las bolitas magnéticas se incubaron durante 10 minutos con esta solución; a continuación se tomó el sobrenadante y se neutralizó con 7 µl de tampón 1 M TrisHCl pH 7,1. Tras la primera ronda de selección se amplificaron los fagos recuperados por métodos ya descritos (Barbas, *et al.*, 2001) y se sometieron a una segunda ronda, en la que la única diferencia fue que se hicieron 10 lavados con tampón TS conteniendo 0,5% Tween-20. Los fagos recuperados se amplificaron y se realizó una tercera ronda de selección, procediendo del mismo modo que para la segunda.

Tras la última ronda de selección los fagos recuperados se usaron para infectar XL1-Blue o ER2738, que se extendieron en placas LB-ampicilina (en el caso de presentación de CTD) o bien se mezclaron con Top-Agar y se extendieron en placas de LB-agar (en el caso de presentación de péptidos). De estas placas se seleccionaron o bien colonias aisladas (presentación de CTD) o bien placas de lisis (presentación de péptidos), de las que se purificó el ADN de los fagémidos o fagos para secuenciar el segmento correspondiente a la proteína o péptido.

Selección en columna. Sólo se utilizó para la selección de fagos-CTD. En este caso la proteína inmovilizada en la columna es CTD, que se acopló al soporte *AffiGel 10* (*BioRad*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1 ml de gel se filtró con tres volúmenes de H₂O fría, y luego se resuspendió en 2,8 ml de una suspensión de CTD 0,9 mg/ml en tampón 20 mM MOPS pH 7,0 (*Sigma*), incubándose durante 4h a 4°C con agitación suave. Luego se montó el gel en una columna *Poly-Prep* de *BioRad* y se lavó con 20 mM MOPS pH 7,0 hasta que la A₂₈₀ bajó a cero. Por último se lavó con tres volúmenes de PBS y se guardó en PBS conteniendo azida sódica al 0,2%. La prueba de selección se realizó cargando 200 µl de la suspensión de fagos que expresaban CTD en su superficie recién purificados (o 200 µl de fagos no presentadores como control), y eluyendo con un gradiente escalonado de NaCl, pasando alícuotas de 2,5 ml de tampón 50 mM fosfato sódico, pH 7,4 conteniendo una cantidad creciente de NaCl en cada alícuota sucesiva, de 20 mM a 220 mM). Se hizo un lavado con tampón 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 1M NaCl y un lavado final con PBS conteniendo azida sódica al 0,2% para guardar la columna. Los fagos recuperados se usaron para infectar XL1-Blue, y se realizaron diluciones sucesivas que se extendieron en placas de LB-ampicilina para proceder a su titulación.

Selección en placas de ELISA activadas para unión covalente. Se utilizaron placas *Nunc Immobilizer Amino*, placas de ELISA funcionalizadas con un grupo electrófilo unido a la placa por un espaciador de etilenglicol que reacciona covalentemente con nucleófilos, lo que permite unir covalentemente un ligando, en este caso la proteína CA, al soporte sólido. El acoplamiento de CA a la placa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se depositaron en cada pocillo 50µl de una solución 200 µg/ml de CA en tampón 50 mM fosfato sódico pH 8,0. Se incubó la placa toda la noche a 4°C y, tras tres lavados con tampón TS conteniendo Tween-20 al 0,1%, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 150 µl de una solución 3% BSA en tampón TS. La selección se realizó incubando 50 µl de suspensión de fagos recién purificados durante 2 h a 37°C, luego se hicieron cinco lavados con TST y se procedió a disociar el fago de la CA mediante una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con 50 µl de una solución 100 mM glicina pH 2,2; que tras ser retirada del pocillo se neutralizó con 3 µl de 2M trizma base. Tras cada ronda de *panning* se titularon y reamplificaron los fagos recuperados por métodos ya descritos (Barbas, *et al.*, 2001).

5.2. Cribado de colonias bacterianas que expresan CTD variantes

La puesta a punto de este sistema fue realizada en colaboración entre la autora de esta memoria y la Lda. Alicia Rodríguez. Para la validación experimental del método se utilizó *E. coli* BL21 (DE3) que expresaban CTD_{wt} o CTD-Q192A. Para la identificación de variantes de CTD que presentan mayor afinidad por CA no mutada se utilizó una biblioteca combinatorial de CTD preparada como se ha descrito en el apartado 4.2. La biblioteca se transformó en células *BL21-Gold* (DE3) (Stratagene), y se guardó en forma de glicerolado. Las poblaciones de bacterias que expresan CTDs (CTD_{wt}, CTD-Q192A, o una mezcla de ambas para la puesta a punto, o CTD combinatorializadas para la identificación de los variantes combinatorializados deseados) se sometieron a un proceso de cribado para identificar las que producían CTDs variantes de mayor afinidad por CA no mutada.

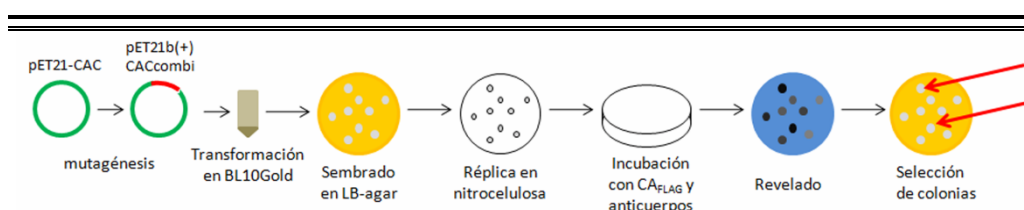


FIGURA 12. Esquema del procedimiento desarrollado para el cribado de colonias que expresan variantes combinatoriales de CTD. Para una descripción, ver texto.

Para ello, se partió de los glicerolados de bacterias apropiados, de los que se inoculó una pequeña cantidad en 2 ml de medio LB suplementado con ampicilina a 0,1 mg/ml. El cultivo se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0,6; momento en el cual se indujo la expresión de proteína con 1 mM isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), prosiguiendo la incubación durante 3 h más a 37°C, con agitación a 250 rpm. De este preinóculo se sembró una cantidad adecuada en placas de LB suplementadas con 0,1 mg/ml ampicilina y 0,25 mM IPTG, de forma que se obtuviera un número elevado de colonias pero suficientemente separadas unas de otras. Estas placas se incubaron toda la noche a 37°C. Se transfirió una réplica de cada placa a membranas de nitrocelulosa *Millipore 0,45 μm HATF* (previamente impregnadas en IPTG 10 mM y secadas a temperatura ambiente) y se lisaron las células mediante incubaciones sucesivas de la membrana de nitrocelulosa en las siguientes soluciones: i) SDS 10%; ii) 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl; iii) 0,5 M TrisHCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl; iv) 60mM citrato trisódico pH 7,4, 150mM NaCl. Se continuó mediante dos lavados en tampón TS. Tras un paso de bloqueo de la membrana con una solución de TS conteniendo 0,1% Tween-20 y 5% leche en polvo durante 30 min, se incubó con 4 ml de solución de proteína CAFLAG (1mg/ml) en solución de bloqueo durante una noche a 4°C. A continuación se incubó con el anticuerpo monoclonal *Anti-FLAG M2* de ratón (*Sigma*), diluido 1:2000 en solución de bloqueo, y por último con el anticuerpo secundario *Goat-antiMouse IgH (H+L)* marcado con peroxidasa

(*BioRad*), diluido 1:2000 en solución de bloqueo. Las membranas fueron reveladas con el kit *Western Lightning Plus-ECL* (*Perkin Elmer*) por autorradiografía en film *Curix RP2 Plus* (*AGFA*). Las colonias que dieron lugar a una señal más fuerte se aislaron para secuenciar la región que codifica CTD en el ADN plasmídico, que fue purificado por *MiniPrep* (Fig. 12).

6. Expresión y purificación de proteínas

Para la realización de algunas purificaciones de proteínas y el análisis mediante filtración en gel, espectroscopía de fluorescencia o de dicroísmo circular (DC), descritos en los siguientes apartados, se contó con la ayuda del Ldo. Miguel Ángel Fuertes.

6.1. Expresión y purificación de CA_{wt}, CA-W184A/M185A y CA_{FLAG}

La expresión y purificación de la proteína CA completa se llevó a cabo mediante un protocolo derivado de uno ya publicado (*Lanman, et al., 2002*). Los plásmidos pWISBH10 de CA_{wt} o mutante se usaron para transformar bacterias *E.coli* BL21(DE3). Una colonia transformante recién obtenida se usó como inóculo para obtener un cultivo de 50 ml en medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Alternativamente se raspó un glicerolado de bacterias *E.coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido adecuado para preparar el preinóculo. La expresión a gran escala se llevó a cabo inoculando 10 ml del precultivo en cada uno de 4 erlenmeyers de 2 L conteniendo 450 ml de LB suplementado con ampicilina (*Sigma*) a una concentración final de 100 µg/ml (LB/Ap). Los cultivos se incubaron a 37°C y entre 230 y 250 rpm hasta alcanzarse una DO₆₀₀ de 0,8. En ese momento se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, e incubando en las mismas condiciones durante 3 h adicionales. Las células se sedimentaron por centrifugación a 4°C y 6000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga *Beckmann Avanti J-26 XP*, con un rotor JLA 10.500, y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Para purificar la proteína las células se descongelaron, para posteriormente resuspenderlas y sonicarlas en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM β-mercaptoetanol. El extracto celular se centrifugó a 15000 rpm durante 1 h en la misma centrífuga, con un rotor *JA 25.50*. El sobrenadante que contiene la proteína se precipitó en baño de hielo mediante la adición de sulfato amónico (*Merck*), la proteína CA precipita entre el 0 y el 25% de saturación de sulfato amónico, mientras que el mutante CA-W184A/M185A y la proteína CA_{FLAG} lo hacen en la fracción entre el 20 y el 40%. La suspensión se centrifugó a 4°C a 15000 rpm en la misma centrífuga con rotor *JA 25.50* y el precipitado de proteína se disolvió en tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM β-mercaptoetanol y se dializó a 4°C frente a tampón 25 mM Tris-HCl pH 8,1, utilizando membranas de *MWCO* de 12000 a

14000 Da (*Medicell International Ltd.*). La solución de proteína obtenida se filtró mediante dispositivos *Millex-GS* de 0,22 μm (*Millipore*).

La solución de proteína obtenida se aplicó a temperatura ambiente a una columna de intercambio iónico de *Q-Sepharose* (*Amersham Biosciences*) de 20 ml, previamente equilibrada en el mismo tampón. La proteína retenida se eluyó a 1 ml/min utilizando un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 M, utilizando un aparato de cromatografía *FPLC* (*Amersham Biosciences*) y recogiendo fracciones de 2 ml. El máximo de elución ocurrió en torno a 200 mM de NaCl para la CA_{wt}, en torno a 100 mM para el mutante W184A/M185A, y en torno a 250 mM para la CA_{FLAG}. Las fracciones correspondientes al pico de proteína se mezclaron y la solución se dializó a 4°C frente a tampón 50 mM fosfato sódico pH 8,0, 150 mM NaCl y se filtró del modo indicado en el párrafo anterior.

Se aplicó la solución de proteína a temperatura ambiente a una columna de exclusión molecular *Superdex 75* de 2,6x53 cm (*Amersham Biosciences*), previamente equilibrada en el mismo tampón. La muestra se eluyó en el mismo tampón, recogiendo fracciones de 3 ml. Las fracciones correspondientes al pico del cromatograma se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, para comprobar su pureza y se mezclaron. La mezcla se dializó a 4°C frente a tampón 50 mM fosfato sódico pH 8,0 y se filtró como se ha indicado más arriba en este apartado. La solución de proteína pura obtenida se dividió en alícuotas y se congeló rápidamente, manteniéndose a -70°C hasta su uso.

6.2. Expresión y purificación del dominio NTD aislado

La expresión y purificación de NTD aislado se llevó a cabo mediante un protocolo derivado del utilizado para la purificación de CA. El plásmido pET21b(+)NTD se empleó para transformar bacterias *E.coli* BL21(DE3). Una colonia transformante recién obtenida se utilizó como inóculo para obtener un cultivo de 50 ml en medio LB con ampicilina. Alternativamente se raspó un glicerolado de bacterias *E.coli* BL21(DE3) transformadas con pET21b(+)NTD para preparar el preinóculo. La expresión a gran escala y purificación se llevó a cabo igual que en el caso de CA, con pequeñas variaciones: en la precipitación fraccionada con sulfato amónico la proteína NTD precipita entre el 30 y el 40% de saturación de sulfato amónico, y en la columna de *Q-Sepharose* el máximo de elución de NTD estuvo en torno a 150 mM de NaCl.

6.3. Expresión y purificación del dominio CTD aislado sin mutar y mutante CTD-19b

La expresión y purificación de CTD aislado se llevó a cabo mediante un protocolo derivado de uno ya publicado (Worthylake, *et al.*, 1999), esencialmente como se describe en (Mateu, 2002). El plásmido pET21b(+)CAC se usó para transformar bacterias *E.coli*

BL21(DE3). Una colonia transformante recién obtenida se usó como inóculo para obtener un cultivo de 50 ml en medio LB con ampicilina. La expresión a gran escala se llevó a cabo igual que en el caso de CA. Alternativamente se raspó un glicerolado de bacterias *E.coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido adecuado (de CTD_{wt} o mutante) para preparar el preinóculo.

Para purificar la proteína las células se descongelaron, para posteriormente ser resuspendidas y sonicadas en tampón 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA. El extracto celular se centrifugó a 15000 rpm durante 1 h en una centrífuga *Beckmann Avanti J-26 XP*, con un rotor *JA 25.50*. El sobrenadante, que contiene la proteína, se sometió en baño de hielo a una precipitación fraccionada utilizando sulfato amónico, obteniéndose tanto el dominio CTD como el CTD-19b en la fracción entre el 40 y el 70% de saturación de sulfato amónico. La suspensión se centrifugó a 4°C a 15000 rpm en la misma centrífuga con rotor *JA 25.50* y el precipitado de proteína se redisolvió en tampón fosfato potásico 25 mM pH 6,0 y se dializó a 4°C frente al mismo tampón utilizando membranas *Spectra/Por* de *MWCO 3500 Da*.

La solución de proteína obtenida se filtró mediante dispositivos *Millex-GS* de 0,22 µm (*Millipore*) y se aplicó a una columna de intercambio catiónico, *SP-Sepharose* (*Amersham Biosciences*) de 5 ml, previamente equilibrada en el mismo tampón. La proteína retenida se eluyó a 1 ml/min utilizando un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 M, utilizando un aparato de cromatografía *FPLC* (*Amersham Biosciences*) y recogiendo fracciones de 2 ml. El máximo de elución ocurrió en torno a 150 mM de NaCl (tanto CTD_{wt} como CTD-19.2). Las fracciones correspondientes al pico de proteína se mezclaron y dializaron a 4°C frente a tampón 25 mM fosfato potásico, pH 6,0.

El dializado se aplicó a una columna de afinidad *Heparin Sepharose* (*Amersham Biosciences*), de 5 ml, previamente equilibrada en el mismo tampón. La elución se hizo igual que con la columna de intercambio catiónico. El máximo de elución ocurrió en torno a 180 mM NaCl (tanto CTD_{wt} como CTD-19b). Las fracciones con proteína se mezclaron y dializaron frente a 25 mM fosfato sódico, pH 7,3, 150 mM NaCl.

Se aplicó la solución de proteína a una columna de exclusión molecular *Superdex75* de 2,6x53 cm (*Amersham Biosciences*), previamente equilibrada en el mismo tampón. La muestra se eluyó en el mismo tampón, recogiendo fracciones de 3 ml. Las fracciones correspondientes al pico del cromatograma se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, para comprobar su pureza y se mezclaron. La mezcla se dializó a 4°C frente a tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7,3, y se concentró mediante ultrafiltración a 4°C a través de dispositivos *Amicon-Ultra 3K*, (*Millipore*). La solución de proteína pura obtenida se dividió en alícuotas y se congeló rápidamente, manteniéndose a -70°C hasta su uso.

6.4. Expresión y purificación del dominio CTD-Δ177 aislado y mutantes puntuales derivados del mismo

La expresión y purificación de CTD-Δ177 se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del *GST Gene Fusion System* (Amersham Biosciences). El plásmido pGEX-CTDΔ177 (pNL4.3 o BH10) se usó para transformar bacterias *E.coli* BL21(DE3). Una colonia transformante recién obtenida se usó como inóculo para obtener un cultivo de 50 ml en medio LB con ampicilina. Alternativamente se raspó un glicerolado de bacterias *E.coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido adecuado para preparar el preinóculo. La expresión a gran escala se llevó a cabo igual que en los casos anteriores.

Para purificar la proteína las células se descongelaron, para posteriormente ser resuspendidas y sonicadas en tampón PBS suplementado con 5 mM dithiothreitol (DTT). El extracto celular se centrifugó a 15000 rpm durante 1 h a 4°C en una centrífuga *Beckmann Avanti J-26 XP*, con un rotor *JA 25.50*. El sobrenadante, que contiene la proteína, se dializó frente a PBS, 5 mM DTT y se aplicó a una columna de afinidad *GSTrap HP* (*GE Healthcare*), previamente equilibrada en el mismo tampón. La proteína retenida se eluyó a 1 ml/min en tampón 50 mM TrisCl pH 8,0, 10 mM glutatión reducido, 5 mM DTT. Las fracciones con proteína se mezclaron y se procedió a la digestión, añadiendo al total de proteína obtenido 10 unidades de trombina (*Amersham Biosciences*) por mg de proteína, y se incubó 16 h a temperatura ambiente con agitación suave. Tras la digestión se dializó frente a PBS, 5 mM DTT y la muestra se aplicó a dos columnas, *GSTrap HP* (*GE Healthcare*) y *HiTrap Benzamidine FF* (*GE Healthcare*) acopladas en serie, y previamente equilibradas con el mismo tampón, para eliminar la GST y la trombina, respectivamente.

La proteína eluída se concentró en tampón PBS, 5 mM DTT y se le permitió alcanzar el equilibrio químico durante varias semanas a 4°C, tras lo cual se aplicó la solución de proteína a una columna de exclusión molecular *Superdex 75* de 2,6x53 cm (*Amersham Biosciences*), previamente equilibrada en el mismo tampón. La muestra se eluyó en el mismo tampón, recogiendo fracciones de 3 ml. Las fracciones correspondientes a los picos de dímero y monómero del cromatograma se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, para comprobar su pureza; en caso necesario se concentraron mediante ultrafiltración en dispositivos *Amicon 3K* (*Millipore*) y se guardaron por separado a 4°C.

6.5. Determinación de la pureza y concentración de proteína

La pureza de las preparaciones de CA, CTD y NTD y sus mutantes se comprobó mediante SDS-PAGE utilizando geles sobrecargados de proteína, que se tiñeron con azul de Coomassie. En ningún caso se observó la presencia de contaminantes.

La concentración de proteína (monómero de CA, CTD o NTD) se determinó mediante la medición de la absorbancia a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro

Shimadzu UV-1603. Los coeficientes de extinción molar a 280 nm (ϵ_{280}) se calcularon como se ha descrito (Match, *et al.*, 1995), mediante la fórmula:

$$\epsilon_{280} = a \times n_W + b \times n_Y + c \times n_{S-S} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Siendo n el número de residuos de Trp, Tyr o puentes disulfuro, $a=5440$, $b=1480$ y $c=134$ unidades de absorbancia ($M^{-1}cm^{-1}$). Los coeficientes calculados son:

$$\epsilon_{280}(CA) = \epsilon_{280}(CA_{FLAG}) = 33254 M^{-1}cm^{-1}$$

$$\epsilon_{280}(CA-W184A/M185A) = 27814 M^{-1}cm^{-1}$$

$$\epsilon_{280}(CTD) = \epsilon_{280}(CTD-\Delta 177) = \epsilon_{280}(CTD-19.2) = 8530 M^{-1}cm^{-1}$$

$$\epsilon_{280}(NTD) = 24980 M^{-1}cm^{-1}$$

7. Ensayos de ensamblaje *in vitro* de la cápsida de VIH-1 y su inhibición por diferentes compuestos

Para la realización de algunos experimentos de inhibición del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 se contó con la ayuda de la Lda. Alicia Rodríguez. La polimerización *in vitro* de CA en partículas con la organización estructural de cápsidas auténticas de VIH-1 se realizó tomando como punto de partida el método de ensayo descrito por (Lanman, *et al.*, 2002) utilizando las modificaciones y condiciones puestas a punto en nuestro laboratorio (Lanman, *et al.*, 2002; del Alamo, *et al.*, 2005). Inmediatamente después de añadir la solución que dispara el ensamblaje a la solución de proteína, se mezclaron los componentes por inversión rápida y repetida de la cubeta y se determinó la OD de la muestra a 350 nm (OD_{350}) a distintos tiempos en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-1603* a temperatura ambiente. Las medidas se tomaron cada 6 segundos, durante un tiempo total de hasta 90 minutos.

7.1. Ensamblaje en solución diluida

La reacción de polimerización en solución diluida se disparó mediante la adición, a 220 μl de una solución de CA en tampón fosfato sódico pH 8,0, de 280 μl de una solución 50 mM fosfato disódico, 4 M NaCl. Las condiciones estándar finales fueron 50 mM fosfato sódico, 2,25 M NaCl y una concentración variable de CA en un volumen final de 500 μl . El pH final de la mezcla, comprobado experimentalmente, fue de 7,4.

7.2. Ensamblaje en presencia de agentes de aglomeración molecular

La reacción de polimerización se disparó mediante la adición a la solución de proteína CA una solución 50 mM fosfato disódico, 4 M NaCl que contiene 179 g/l de Ficoll-70 (*GE Healthcare*) o bien 90 g/l de Dextrano-T40 (*GE Healthcare*). Las condiciones finales fueron 50 mM fosfato sódico, 2,25 M NaCl, 100 g/l Ficoll-70 (o 50 g/l Dextrano-T40) y una concentración variable de CA en un volumen final de 500 μ l.

7.3. Ensayos de inhibición del ensamblaje *in vitro* de cápsidas de VIH-1

La capacidad inhibitoria de distintos compuestos se ensayó tanto en ausencia como en presencia de agentes de aglomeración molecular, a diferentes relaciones molares inhibidor : CA como se indica en los apartados correspondientes de Resultados. Las soluciones de proteína CA y de los compuestos a ensayar se mezclaron en las cantidades apropiadas para obtener la relación molar deseada, y la mezcla se dejó equilibrar durante 30 minutos en baño de hielo, disparando a continuación la reacción de polimerización como se ha indicado en los apartados 7.1 o 7.2.

7.4. Análisis de las cinéticas de polimerización

La polimerización de CA produce un aumento de la densidad óptica en función del tiempo que se ajusta muy bien a la ecuación de Hill:

$$OD = OD_f \left(\frac{(t/t_{50})^n}{1 + (t/t_{50})^n} \right)$$

(Ecuación 3)

donde OD es la densidad óptica en el tiempo t , OD_f es la densidad óptica a tiempo infinito, t_{50} es el tiempo en el que OD es la mitad que OD_f y n es un parámetro de cooperatividad.

La tasa de polimerización k_p en cada condición testada se determinó de la pendiente obtenida por ajuste lineal de la parte recta de la curva. La relación k_{pi}/k_{p0} entre la tasa de polimerización en presencia o ausencia de inhibidor da la reducción en la tasa de polimerización a cada concentración de inhibidor ensayada.

La cantidad relativa de cápsidas formada se estimó de la OD_{350} correspondiente a la meseta de las curvas de turbidez (Lanman, *et al.*, 2002; del Alamo y Mateu, 2005; del Alamo, *et al.*, 2005). La relación OD_i/OD_0 entre la OD en la meseta en presencia o ausencia

de un inhibidor da la reducción en la cantidad de cápsida formada a cada concentración de inhibidor ensayada.

8. Estudios cinéticos de asociación y disociación de CTD

La dimerización de CTD y su disociación en monómeros ocurren muy rápidamente. Por tanto, las cinéticas de estas reacciones se analizaron en experimentos de flujo detenido (*stopped-flow*). Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Prof. J.L. Neira en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández bajo su supervisión, utilizando un aparato *PiStar-180* de *Applied Photophysics*, adecuadamente configurado para medidas de cinética rápida mediante flujo detenido.

El proceso de disociación-desnaturalización del dímero de CTD para dar dos monómeros desnaturalizados sigue un modelo de tres estados $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$ (Mateu, 2002), siendo N_2 el dímero, I un intermediario monomérico (esencialmente pero no totalmente plegado), y U el monómero desnaturalizado. La reacción de asociación/disociación $N_2 \leftrightarrow 2I$ puede seguirse de modo específico mediante determinación de la variación en la intensidad de fluorescencia debida al único triptófano, W184, que se encuentra en la interfase de dimerización. El proceso de plegamiento-desplegamiento es invisible por esta técnica porque no altera la exposición de W184 al solvente. De este modo, los procesos cinéticos observados mediante fluorescencia de Trp corresponden exclusivamente a la reacción de disociación o a la de asociación. Todas las cinéticas se siguieron ajustando el fotomultiplicador a 440 V, durante 70 ms, tomando 500 puntos en escala logarítmica, con una longitud de onda de excitación de 295 nm (específica para triptófano) y una longitud de onda de emisión de 320 nm.

8.1. Disociación del dímero de CTD

Determinación de la constante de velocidad de disociación a diferentes concentraciones de CTD. Se partió de soluciones 100 μM y 300 μM de CTD (91 y 99,9% de CAC en forma de dímero, respectivamente, considerando una constante de disociación de 10 μM (Gamble, *et al.*, 1997) en tampón 25 mM fosfato sódico, pH 7,3; que se mezclan en proporción 1:10 con una solución 7 M GdmHCl en el mismo tampón, quedando la mezcla final 10 ó 30 μM CTD, 6,3 M GdmHCl, 25mM fosfato sódico, pH 7,3, condiciones en las que, según datos previos, CTD se encuentra esencialmente desnaturalizada. Las curvas obtenidas se ajustaron con el programa *KaleidaGraph* (*Synergy Software*) a la ecuación exponencial:

$$I(t) = I_f + Ae^{-k_{dis}t}$$

(Ecuación

4)

donde $I(t)$ es la intensidad de fluorescencia a tiempo t , I_f es la intensidad de fluorescencia a $t = \infty$, A es la amplitud de la señal y k_{dis} la constante de velocidad de disociación.

Determinación de la constante de velocidad de disociación de CTD a diferentes concentraciones de GdmHCl. Se partió de una solución 100 μM CTD en tampón 25 mM fosfato sódico, pH 7,3; que se mezcló en proporción 1:10 con una solución GdmHCl a distintas concentraciones (3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5 y 7M) en el mismo tampón, quedando la mezcla final 10 μM CTD, 25 mM fosfato sódico, pH 7,3, GdmHCl 2,7 M, 3,15 M, 3,6 M, 4,05 M, 4,5 M, 4,95 M, 5,4 M, 5,85 M ó 6,3 M, condiciones en las que, según datos previos, CTD se encuentra esencialmente desnaturalizada. El ajuste de las curvas obtenidas se hizo como en el apartado anterior.

8.2. Dimerización de CTD

Determinación de la constante de velocidad de reasociación a diferentes concentraciones de CTD. Se hicieron experimentos partiendo de soluciones 1 mM y 300 μM CTD en tampón 25 mM fosfato sódico, pH 7,3, 3,5 M GdmHCl en que CTD se encuentra esencialmente desnaturalizada. Las soluciones se mezclaron en proporción 1:10 con 25 mM fosfato sódico, pH 7,3, quedando la mezcla final 100 μM ó 30 μM CTD en tampón 25 mM fosfato sódico, pH 7,3, 0,35 M GdmHCl. En estas condiciones se alcanza un equilibrio en el que la proporción de dímero es de aproximadamente 90% o 25%, respectivamente. Las curvas así obtenidas se ajustaron con el programa *KaleidaGraph* a la ecuación:

$$I(t) = I_f - \left(\frac{A}{(C_t k_{as} t + 1)} \right)$$

(Ecuación 5)

donde $I(t)$ es la intensidad de fluorescencia a tiempo t , I_f es la intensidad de fluorescencia a $t = \infty$, A es la amplitud de la señal, C_t es la concentración total de proteína (monómero) y k_{as} es la constante de velocidad de asociación.

Determinación de la constante de velocidad de reasociación de CTD a diferentes concentraciones de GdmHCl. Se parte de una solución 1 mM CTD en tampón 25 mM fosfato sódico, pH 7,3 y de soluciones de GdmHCl a distintas concentraciones (2, 3, 4, 5, 6 y 7M) que se mezclan en proporción 1:10 con tampón 25 mM fosfato sódico, pH

7,3, quedando la mezcla final 100 μ M CTD, 25 mM fosfato sódico, pH 7,3, GdmHCl 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M ó 0,7 M, condiciones en las que, según datos previos, CTD se encontrará casi completamente (en un 90%) en forma dimérica. El ajuste de las curvas obtenidas se hizo como en el apartado anterior.

8.3. Cálculo de la constante de equilibrio de dimerización CTD-CTD.

A partir de las constantes cinéticas de asociación y disociación se calculó la constante de equilibrio de la reacción de disociación, o constante de disociación (K_{dis}) según la ecuación:

$$K_{dis} = \frac{k_{dis}}{k_{as}}$$

(Ecuación 6)

La constante de asociación o afinidad K_{as} es la inversa de la K_{dis} .

9. Determinación de constantes de afinidad mediante cromatografía analítica de filtración en gel

Las constantes de afinidad de dimerización K_{as} o de disociación del dímero K_{dis} para el mutante combinatorial de CTD-19b, y para el mutante CTD- Δ 177, se determinaron mediante cromatografía analítica de filtración en gel. Se empleó siempre la misma columna de exclusión molecular *Superdex75 HR10/30* (Amersham Biosciences) adecuadamente calibrada. La recta de calibración de la columna relaciona el coeficiente de partición del peso promedio (σ_w) (Darling, *et al.*, 2000) con el logaritmo del peso molecular aparente (MW_{app}) de la especie eluida:

$$\sigma_w = 2,4716 - 0,4848 \cdot \log MW_{app} \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$\alpha = ((V_t - V_e) / (V_t - V_0))$$

(Ecuación 8)

donde V_e es el volumen de elución de la muestra en cuestión. V_0 (volumen vacío) y V_t (volumen total de la columna) fueron previamente determinados como se ha descrito (Mateu y Fersht, 1998).

Para calcular la constante de asociación del mutante CTD-19b, la columna se equilibró en tampón 25 mM fosfato sódico, pH 7,3 o, cuando se especifica, en 25 mM fosfato sódico pH 7,3, 150mM NaCl. La K_{as} se calculó tanto por el método de elución frontal (más preciso) como por el de elución zonal. A esta columna, conectada a un equipo FPLC y mantenida a 23°C se aplicaron alícuotas de 15 ml (elución frontal) o de 200 µl (elución zonal) de CTD-19b o CTD_{wt} (como control) a una concentración total de proteína (monómero) de entre 0,5 y 60 µM, en el mismo tampón. Las muestras se eluyeron a 1 ml/min (o a 0,7 ml/min cuando se especifica), registrándose la absorbancia a 280 nm (A_{280}) mediante un detector UV en línea. El volumen de elución para cada concentración (C_t) se determina como el punto medio de la curva ascendente característica del cromatograma (elución frontal) o como el máximo del pico (elución zonal). Los valores experimentales de σ_o obtenidos a distintas C_t se ajustaron utilizando el programa *Kaleidagraph* (*Sinergy Software*) a la ecuación (Darling, *et al.*, 2000):

$$\sigma_o = \left(\frac{(-1 + \sqrt{(1 + 8K_{as} C_t)})}{(4K_{as} C_t)} \right) \sigma_m + \left(\frac{(1 - (-1 + \sqrt{(1 + 8K_{as} C_t)})}{(4K_{as} C_t)} \right) \sigma_d \quad (Ecuación 9)$$

donde σ_m y σ_d son los coeficientes de partición para el monómero y el dímero, respectivamente. La energía libre de asociación ΔG_{as} se calculó utilizando la ecuación:

$$\Delta G_{as} = -RT \ln K_{as} \quad (Ecuación 10)$$

donde R es la constante de los gases ideales y T la temperatura absoluta.

Para el mutante CTD-Δ177, las reacciones de asociación y disociación son tan lentas que las constantes de velocidad y la constante de equilibrio de asociación pudieron determinarse a partir de la determinación directa de las proporciones de monómero y dímero. La proporción de las dos formas en el equilibrio se determinó para CTD-Δ177 y variantes del mismo con mutaciones en la interfase de dimerización aplicando a la columna alícuotas de 100 µl de la proteína purificada a la concentración total indicada en cada caso. El cromatograma se amplió, se recortaron los picos de dímero y monómero y se pesaron en una balanza analítica *Mettler AJ1500*, para obtener una estimación de las proporciones de dímero y monómero presentes en la preparación.

Para calcular las constantes cinéticas de asociación y disociación de CTD-Δ177, las fracciones de dímero y monómero se separaron en la columna Superdex75 de 2,6x53cm y se utilizaron inmediatamente. Para calcular la constante cinética de dimerización la fracción de monómero aislado se concentró inmediatamente hasta 300 µM y se tomó el tiempo 0 de la reacción. A tiempos sucesivos, medidos en días, se

aplicaron alícuotas de 100 μl a la columna *Superdex75 HR10* y se estimaron las proporciones de dímero y monómero a cada tiempo. Se representó gráficamente el porcentaje de dímero obtenido en función del tiempo, y los datos se ajustaron a la Ec. 5 correspondiente a un proceso de asociación de segundo orden (sustituyendo la intensidad de fluorescencia por la proporción de dímero).

Para calcular la constante cinética de disociación, se utilizó la fracción de dímero recién aislado a una concentración de 20 μM , tomando inmediatamente el tiempo 0 de la reacción. A tiempos sucesivos, medidos en días, se aplicaron alícuotas de 100 μl a la columna *Superdex75 HR10* y se estimaron las proporciones de dímero y monómero a cada tiempo. Se representó gráficamente el porcentaje de dímero presente en la fracción de dímero inicial en función del tiempo y los datos se trataron de ajustar a la Ec. 4 correspondiente a una exponencial sencilla. Dado que el ajuste no era satisfactorio, se volvieron a ajustar los datos utilizando en este caso a una ecuación correspondiente a la suma de dos procesos de disociación exponencial:

$$D(t) = D_f + A_1 e^{-k_{dis1}t} + A_2 e^{-k_{dis2}t} \quad (\text{Ecuación 11})$$

donde $D(t)$ es la proporción de dímero a tiempo t , D_f es la proporción de dímero a $t=\infty$, A_1 y A_2 son las amplitudes de los dos procesos que se observan y k_1 y k_2 son las constantes cinéticas de los dos procesos de disociación considerados.

10. Espectroscopía de fluorescencia

Las determinaciones de fluorescencia intrínseca de proteínas se llevaron a cabo esencialmente como se ha descrito previamente (Mateu, 2002), utilizando un espectrofluorímetro *Varian Eclipse* equipado con una unidad *Peltier* de control de temperatura conectado a un PC.

Para CTD- $\Delta 177$ se realizaron experimentos de equilibrio de disociación y/o desnaturalización química en los que se determinó el espectro de fluorescencia intrínseca de triptófano de soluciones de dímero y monómero aislados (recién separados mediante cromatografía de filtración en gel) a una concentración de proteína (monómero) de 20 μM , en tampón 25 mM fosfato sódico pH 7,4, conteniendo diferentes concentraciones de GdmHCl (de 0 a 6M). Se utilizó una cubeta de 2 mm x 10 mm, con un paso óptico de 2 mm para la luz incidente (*Hellma*) y rendijas de excitación y emisión de 5 mm. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y se registraron los espectros de emisión como un promedio de diez barridos entre 310 y 400 nm, a una velocidad de barrido de 120 nm/min. El voltaje en el fotomultiplicador se ajustó a 650 V, y la temperatura se mantuvo

constantemente a 25°C, y a cada muestra se le permitió alcanzar el equilibrio químico y térmico previamente a la medición.

Para CTD_{wt} (control) y CTD-19b se determinaron los espectros de fluorescencia del mismo modo descrito para CTD-Δ177.

11. Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)

Las determinaciones mediante espectroscopía DC en el ultravioleta lejano se llevaron a cabo esencialmente como se ha descrito previamente (Mateu, 2002), utilizando un espectropolarímetro *JASCO-600 (JASCO Europe SLR)*, equipado con un controlador de temperatura *NESLAB RTE-100* conectado a un PC. Se utilizaron cubetas de 1 cm de paso óptico (*Hellma*). Los espectros en el UV lejano se registraron como un promedio de cuatro barridos entre 190 y 250 nm a una velocidad de 50 nm/min, un tiempo de respuesta de 2 s y un ancho de banda de 1 nm.

Los espectros de DC de CTD-19b a distintas concentraciones de proteína se obtuvieron en tampón 25 mM fosfato sódico, pH 7,4.

Los experimentos de disociación y/o desnaturalización química de dímero y monómero aislados de CTD-Δ177 se hicieron a una concentración de proteína de 20 μM en el mismo tampón, conteniendo diferentes concentraciones de GdmHCl (de 0 a 6M). Se dejó a las muestras alcanzar el equilibrio termodinámico y se realizaron los espectros a 25°C. Los valores de elipticidad molar obtenidos a cada concentración de GdmHCl se ajustaron como se indica en el apartado 11.1, utilizando el programa *Kaleidagraph*.

Los experimentos de desnaturalización térmica del monómero de CTD-Δ177 sin mutar o con mutaciones en la interfase de dimerización se realizaron utilizando una concentración de proteína de 20 μM en el mismo tampón. La muestra se sometió a un gradiente de temperatura de 4 a 90°C a razón de 0,5°C/min, midiendo la elipticidad a 222 nm. Los valores de elipticidad molar obtenidos se ajustaron como se indica en el apartado 11.1, utilizando el programa *Kaleidagraph*.

11.1. Análisis del equilibrio de desnaturalización seguido mediante DC

Los espectros de DC en el ultravioleta lejano del dímero y el monómero de CTD, CTD-19b y CTD-Δ177 son iguales entre sí, de modo que el proceso de dimerización/disociación es invisible para esta técnica, que detecta exclusivamente el proceso de plegamiento/desnaturalización del intermediario monomérico (ver Resultados). Por lo tanto, los datos de equilibrio obtenidos mediante espectroscopía de

DC de dímero y monómero de CTD177 se ajustaron a una transición unimolecular entre dos estados (monómero nativo-monómero desnaturalizado) (Mateu, 2002). Las constantes de equilibrio para esta transición, K_u , y el correspondiente valor de energía libre se definen como:

$$K_u = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f_u}{(1 - f_u)}$$

(Ecuación 12)

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u$$

13)

(Ecuación

donde f_u es la fracción de proteína disociada/desnaturalizada, R es la constante de los gases ideales y T es la temperatura absoluta. Para cualquier concentración de agente desnaturalizante $[D]$, f_u se calculó, a partir de los valores obtenidos para la elipticidad a 222 nm (apartado anterior), mediante la siguiente expresión:

$$f_u = \frac{[I - (I_{no} + m_n[D])]}{[(I_{uo} + m_u[D]) - (I_{no} + m_n[D])]}$$

(Ecuación 14)

donde I es el valor de la elipticidad a la concentración de agente desnaturalizante $[D]$; I_{no} y I_{uo} son los valores de elipticidad correspondientes a la proteína en estado nativo (n) o desnaturalizado (u), extrapolados a un valor $[D]=0$; y m_n y m_u son las pendientes de las líneas base correspondientes a la región previa (estado nativo o asociado) y posterior (estado desnaturalizado o disociado) a la transición, respectivamente. Estas pendientes se obtuvieron por regresión lineal.

A partir de las ecuaciones 12-14 se calculan los valores de energía libre ΔG_u correspondientes:

$$\Delta G_u = -RT \ln \left\{ \frac{[I - (I_{no} + m_n[D])]}{[I_{uo} + m_u[D] - I]} \right\}$$

(Ecuación 15)

Cálculo de los parámetros de desnaturalización química: Para el cálculo de $[D]_{50\%}$, m (la variación en ΔG_u con la concentración de desnaturalizante) y $\Delta G_u^{H_2O}$, los

valores de ΔG_u obtenidos utilizando la ecuación 15 para las distintas $[D]$ dentro de la región de transición de la curva de desnaturalización, se aplicaron en las siguientes expresiones:

$$\Delta G_u = \Delta G_u^{H_2O} - m[D] \quad \text{(Ecuación 16)}$$

$$\Delta G_u = m([D]_{50\%} - [D]) \quad \text{(Ecuación 17)}$$

Cálculo de los parámetros de desnaturalización térmica del monómero CTD- $\Delta 177$ y sus variantes: Para calcular T_m y $\Delta H_u^{T_m}$ (entalpía de desnaturalización a la temperatura T_m), los valores de ΔG_u para cada temperatura T en la zona de transición de las curvas de desnaturalización, obtenidos mediante el uso de la ecuación 16, se aplicaron en la siguiente ecuación:

$$\Delta G_u = \Delta H_u^{T_m} \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) + \Delta C_p \left[T - T_m - T \ln \frac{T}{T_m} \right] \quad \text{(Ecuación 18)}$$

Para poder hacer el ajuste se asumió un valor de ΔC_p de 1200 cal/mol, correspondiente al rango normal de capacidad calorífica determinada para la desnaturalización de proteínas. Variar esta constante a valores en los límites inferior y superior del rango normal no produjo cambios significativos en los valores obtenidos para T_m o $\Delta H_u^{T_m}$. Sin embargo, dado que el valor real de ΔC_p de la desnaturalización no es conocido, no se calcularon los valores de ΔG_u en este caso.

Los parámetros termodinámicos para la desnaturalización química o térmica se obtuvieron, alternativamente, mediante el ajuste directo, no lineal, de los valores experimentales de elipticidad a la siguiente ecuación:

$$I = \frac{[(U_{ND} + m_N[D]) + (U_{ND} + m_N[D])e^{(-\Delta G_u/RT)}]}{1 + e^{(-\Delta G_u/RT)}} \quad \text{(Ecuación 19)}$$

En estas ecuaciones $[D]$ representa los valores de concentración de GdmHCl en los experimentos de desnaturalización química o la temperatura absoluta en los experimentos de desnaturalización térmica.

La utilización combinada de las ecuaciones 19 y 16 rindió directamente los valores de ajuste para los parámetros ΔG_w , m , I_{n0} , I_{u0} , m_n y m_u . Los dos métodos de ajuste empleados dieron valores similares, apreciándose algunas pequeñas diferencias no significativas, que se deben a las diferentes valoraciones de las líneas de base situadas antes y después de la región de transición.

12. Ultracentrifugación analítica

Los experimentos de ultracentrifugación analítica se realizaron en el laboratorio del Dr. Germán Rivas (Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid), bajo su supervisión y con la colaboración de los Drs. Mercedes Jiménez y Carlos Alfonso. Este tipo de experimentos permite estudiar las interacciones proteína-proteína (Minton, 1994; Lebowitz, *et al.*, 2002; Howlett, *et al.*, 2006).

12.1. Velocidad de sedimentación

Para los experimentos de velocidad de sedimentación se utilizó una ultracentrífuga analítica *Optima XL-A* (Beckman) equipada con una unidad óptica UV-VIS. Se utilizó un rotor *An-50 Ti* y celdas de medida de doble sector de 12 mm de paso óptico. Las condiciones de centrifugación fueron 48000rpm, 20°C y 4h. Los perfiles de sedimentación se registraron cada 3 minutos a las longitudes de onda indicadas en cada caso. El análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos se realizó mediante el ajuste directo de soluciones a la ecuación de Lamm (Ecuación 20) a los perfiles de sedimentación con el programa SEDFIT (Schuck, 2000; Schuck, *et al.*, 2002).

$$J_i = s_i w_i \omega^2 r - D_i \frac{dw_i}{dr}, \quad \text{(Ecuación 20)}$$

donde J_i es el flujo de la especie i en unidades de masa/(área x tiempo), w_i es su concentración (peso/volumen), ω es la velocidad angular del rotor (radianes/segundo), r es la posición radial y s_i y D_i son los coeficientes de sedimentación y difusión traslacional de la especie molecular, respectivamente, siendo ambos propiedades de la especie molecular i en un determinado disolvente. El mejor ajuste obtenido de los perfiles de sedimentación experimentales a las soluciones de la ecuación de Lamm proporciona una

distribución $c(s)$ que representa la concentración inicial de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación s . Los valores de s fueron corregidos a condiciones estándar (agua, 20°C y dilución infinita) utilizando el programa SEDNTERP, lo que nos dio los correspondientes valores estándar de coeficientes de sedimentación ($s_{20,w}$).

Velocidad de sedimentación de NTD. Se prepararon alícuotas de 400 µl de la proteína NTD a 80 µM en distintos tampones: 50 mM fosfato sódico pH 8,0; 50 mM fosfato sódico pH 7,8, 1 M NaCl; 50 mM fosfato sódico pH 7,8, 150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, 50 mM citrato sódico, 75 mM NaCl pH 8,0. Los perfiles de sedimentación se registraron a 250 nm.

Velocidad de sedimentación de CA-W184A/M185A. Se llevó a cabo por duplicado con CA-W184A/M185A 150 µM en tampón 50 mM fosfato sódico pH 7,0, 2,25 M NaCl. Los perfiles de sedimentación se registraron a 300 nm.

12.2. Equilibrio de sedimentación en solución diluida

Se llevó a cabo un experimento de equilibrio de sedimentación con la proteína NTD para determinar sus propiedades de autoasociación en función de la concentración de proteína. Para los experimentos de equilibrio de sedimentación se utilizó una ultracentrífuga analítica *Optima XL-A* (Beckman) equipada con una unidad óptica UV-VIS. Se utilizó un rotor *An-50 Ti* y celdas de dos agujeros de 12 mm de paso óptico, excepto para la alícuota más concentrada, que se usó una celda de 3 mm de paso óptico para reducir la señal de absorbancia 4 veces. Se prepararon alícuotas de 100 µl de la proteína NTD a varias concentraciones (0,33; 0,1; 0,3 y 1 mM) en tampón 50 mM fosfato sódico pH 7,8, 2,25 M NaCl. El equilibrio de sedimentación se analizó a dos velocidades diferentes, 18000 y 20000 rpm a 20°C. Después de alcanzado el equilibrio a cada una de las velocidades, momento en el cual el gradiente de concentraciones de la muestra no varía con el tiempo (se realizan medidas a intervalos de 3 horas hasta alcanzar el equilibrio), se llevó a cabo una centrifugación a alta velocidad (48000 rpm) para determinar la línea base correspondiente. Para cada concentración usada se determinó la masa molecular de flotación aparente de NTD ($M_{w,app}$) mediante el ajuste de los gradientes de equilibrio de sedimentación obtenidos a la ecuación que describe la distribución radial del gradiente de concentración en el equilibrio para un soluto macromolecular (Minton, 1996) (Ec. 21), usando el programa HeteroAnalysis (Cole, 2004):

$$s_x(r) = s_x(r_0) e^{\left[\frac{M_{w,app} \omega^2}{2RT} (r^2 - r_0^2) \right]}, \quad (21) \quad \text{(Ecuación)}$$

donde $s_x(r)$ es la magnitud de una señal proporcional a la concentración (peso/volumen) de nuestra proteína en una posición radial r , r_0 es una posición de

referencia elegida arbitrariamente, ω es la velocidad angular, R es la constante de los gases ideales y T es la temperatura absoluta. A partir de $bM_{w,app}$ se puede calcular la masa molecular promedio de la proteína:

$$bM_{w,app} = M_w(1 - (\rho)), \quad (Ecuación 22)$$

donde $bM_{w,app}$ y M_w son la masa molecular de flotación promedio y la masa molecular promedio de NTD, respectivamente, v el volumen específico parcial teórico de la proteína, que se calcula a partir de su secuencia de aminoácidos (Laue, *et al.*, 1992), que en el caso de NTD es de 0,7381 ml/g; y ρ la densidad teórica del buffer, que se calcula a partir de su composición. Ambos parámetros se calcularon con el programa SEDNTERP.

12.3. Equilibrio de sedimentación en presencia de agentes de aglomeración molecular.

Para los experimentos de equilibrio de sedimentación en presencia de un agente de aglomeración molecular se utilizó una ultracentrífuga *Beckman Coulter Optima Max XL*, con rotor *TLS-55*. Las condiciones de centrifugación fueron 20000 rpm 69 h, lo que permite alcanzar el equilibrio de sedimentación. La centrífuga se hace parar sin freno para no distorsionar el gradiente de concentración.

Equilibrio de sedimentación de NTD en entorno aglomerado. Las muestras de 70 μ l de NTD a 1 mM en tampón 50 mM fosfato sódico pH 7,8, 2,25 M NaCl y con concentraciones variables de Ficoll-70 (*GE- Healthcare*) (0, 50, y 100 g/l) como agente inerte de aglomeración molecular, se pusieron en tubos pequeños de policarbonato sobre 90 μ l de fluorocarbono (*Fluorinert FC43*) y se taparon con 70 μ l de aceite mineral (*Dow Corning Low Density*).

Equilibrio de sedimentación de CA-W184A/M185A en entorno aglomerado. Las muestras de 70 μ l de CA-W184A/M185A a 300 μ M en tampón 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 2,25 M NaCl y con concentraciones variables de Ficoll-70 (*GE- Healthcare*) (0, 50, 75 y 100 g/l) como agente inerte de aglomeración molecular, se pusieron en tubos pequeños de policarbonato sobre 90 μ l de fluorocarbono (*Fluorinert FC43*) y se taparon con 70 μ l de aceite mineral (*Dow Corning Low Density*).

Análisis de los equilibrios de sedimentación en entorno aglomerado. Inmediatamente después de la centrifugación se dividieron los gradientes con un microfraccionador *Brandel FR-115* en fracciones de 3,5 μ l que se diluyeron 1:50, en el tampón correspondiente para medir A_{280} y poder representar los gradientes. Para cada concentración de Ficoll-70 usada se determinó la masa molecular de flotación aparente de NTD o CA-W184A/M185A ($bM_{w,app}$) mediante el ajuste de los gradientes de equilibrio

de sedimentación obtenidos a la ecuación 20 usando los programas *MatLab* o *SigmaPlot*. La dependencia de $bM_{w,app}$ con la concentración del agente de aglomeración molecular (Ficoll-70) se analizó usando los procedimientos descritos en (Rivas, *et al.*, 1999). Brevemente, si se asume que NTD (o CA-W184A/M185A) no se asocia con el Ficoll-70 en presencia de altas concentraciones del mismo, entonces se cumple que:

$$bM_{w,app} = bM_T - w_C bM_{C,app} \left(\frac{\partial \ln r_T}{\partial w_C} \right), \quad (Ecuación 23)$$

donde T y C denotan la proteína de interés (NTD o CA-W184A/M185A) y el agente de aglomeración molecular (Ficoll-70), respectivamente, $bM_{C,app}$ es la masa molecular de flotación aparente del agente de aglomeración molecular, y $\partial \ln r_T / \partial w_C$ es una medida termodinámica de la energía libre de interacción entre la proteína de interés y el agente de aglomeración molecular. Este valor puede calcularse en función de la concentración de C utilizando la teoría de partículas rígidas (Minton, 1998).

Se consideró una solución conteniendo NTD o CA-W184A/M185A (T) en una concentración arbitraria de Ficoll-70 (C). La interacción termodinámica entre T y C se modeló utilizando el modelo de partículas rígidas para ambos solutos (T y C), con volúmenes efectivos v_T y v_C , utilizando las ecuaciones 10 a 12 descritas en (Rivas, *et al.*, 1999).

13. Transporte de péptidos al interior de células

La puesta a punto del transporte de péptidos al interior de células eucarióticas se realizó en colaboración entre la autora de esta memoria y la Dra. Inmaculada López.

Para transportar los péptidos al interior de las células de mamífero se utilizó el reactivo comercial *Chariot (Active Motif)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se prepararon los complejos Chariot-péptido incubando durante 30 minutos, entre 5 y 50 μg del péptido adecuado (marcado con FITC para las células NB324K o con Rhodamina para las U87-CD4-CXCR4) con Chariot en una proporción molar 1:1, en un volumen final de 100 μl . Tras la incubación, los 100 μl de cada complejo Chariot-péptido se añadieron a un pocillo de M24 sembrado el día anterior con NB324K o U87-CD4-CXCR4 (con $5 \cdot 10^4$ o $1,5 \cdot 10^5$ células por pocillo, respectivamente), añadiendo a todo ello 100 μl de medio DMEM sin suero. Tras un periodo de incubación de entre una y tres horas a 37°C con un 5% CO₂ en atmósfera húmeda, se añadieron 800 μl de medio DMEM, 10% SBF y se prolongó la incubación una hora más. Finalmente las células se

fijaron con una mezcla de metanol-acetona 1:1, se tiñeron los núcleos con 4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride (DAPI) (*Calbiochem*) y se observaron y fotografiaron las preparaciones en un microscopio *Axiovert200* (*Zeiss*) o en un microscopio confocal *LSM-510* (*Zeiss*).

14. Inhibición de la infección de células en cultivo por VIH-1

Los ensayos de inhibición por péptidos de la infección de células en cultivo por VIH-1 se realizaron por la Dra. María Nevot en el laboratorio y con la supervisión del Dr. Miguel Ángel Martínez, en colaboración con la autora de esta memoria.

La transfección de los péptidos a células U87-CD4-CXCR4, susceptibles de infección por VIH-1, se hizo básicamente como se describe en el apartado 13, con la salvedad de que en el periodo de incubación con el complejo Chariot-péptido, en vez de DMEM se utilizó medio OptiMEM (*Gibco*). Tras la incubación se procedió a la infección del cultivo con un stock de virus HXB2 a una multiplicidad de infección de 0,0015 (correspondientes a 1300 pg de antígeno p24). Tras dos horas de incubación a 37°C se lavó con PBS y se añadió a las células DMEM suplementado con SBF al 10%, 0,5 mg/ml de geneticina y 1 µg/ml de puromicina, y se incubaron a 37°C con un 5% CO₂ en atmósfera húmeda. A las 72h postinfección se recogió el sobrenadante de infección y se determinó la cantidad de antígeno p24 como medida del nivel de infección del cultivo, mediante un ensayo de ELISA con el kit *INNOTEST HIV-antigen* (*Innogenetics*).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Efecto de la aglomeración molecular y otros factores en la hexamerización de CA durante el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1

El ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 implica la hexamerización de CA, principalmente a través del dominio NTD, y la unión de los hexámeros a través de la dimerización del dominio CTD. Sin embargo, mientras que CTD aislado forma dímeros en solución diluida, ni NTD aislado ni CA completa (con la interfase de dimerización inactivada para impedir la polimerización) forman hexámeros en solución, ni siquiera a concentraciones muy elevadas de proteína (Lanman, *et al.*, 2002; Lanman, *et al.*, 2003). La polimerización de CA intacta para formar partículas semejantes a cápsidas maduras tampoco ocurre *in vitro*, a no ser en presencia de una fuerza iónica extremadamente elevada (no fisiológica). Sin embargo, resultados previos de nuestro grupo habían mostrado que en condiciones de aglomeración molecular que se aproximan a las existentes en el virión, la polimerización de CA *in vitro* es fuertemente promovida, de modo que se consigue un ensamblaje eficiente de partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 incluso a fuerza iónica baja, similar a la fisiológica ((del Alamo y Mateu, 2005; del Alamo, *et al.*, 2005).

Como un primer objetivo del presente trabajo, nos planteamos analizar si esta estimulación del ensamblaje de la cápsida en un entorno aglomerado podría deberse, en parte, a la estimulación del proceso de hexamerización de CA. Si éste fuera el caso, la utilización de un medio aglomerado podría permitir el aislamiento de hexámeros de NTD o CA en solución, para su estudio estructural y termodinámico y para facilitar el diseño racional de inhibidores de ensamblaje dirigidos a las interfases de hexamerización.

Para poder analizar específicamente el proceso de hexamerización, las interacciones entre los posibles hexámeros se impidieron bien utilizando NTD aislado, o bien utilizando CA completa pero con la interfase de dimerización inactivada de modo específico, a través de la introducción de dos mutaciones en ella (W184A y M185A). El estado de oligomerización en solución se evaluó mediante ultracentrifugación analítica en experimentos de velocidad de sedimentación o equilibrio de sedimentación, en colaboración con el Prof. Germán Rivas y su grupo (apartado 12 de Materiales y Métodos). En experimentos de control se analizó mediante turbidimetría (apartado 7 de Materiales y Métodos) la capacidad de polimerización de CA no mutada en las mismas condiciones usadas para la hexamerización de NTD aislado o de CA mutada. La formación en estas condiciones de estructuras con la organización de cápsidas maduras auténticas de VIH-1 se ha comprobado en experimentos control mediante microscopía electrónica (Lanman, *et al.*, 2002; del Alamo y Mateu, 2005).

1.1. Efecto de la aglomeración molecular sobre la hexamerización del dominio NTD aislado

El NTD aislado de CA de MLV es capaz de cristalizar en forma de hexámeros que presentan una estructura similar a la observada en la cápsida madura de VIH-1 (Mortuza, *et al.*, 2004). Por lo tanto, el NTD es el principal responsable de la hexamerización de CA. Sin embargo, en el caso de VIH-1, no se han obtenido hexámeros de NTD. Razonamos que una primera posibilidad para explicar esta diferencia es que la afinidad entre monómeros de NTD fuera, en el caso de VIH-1, aún menor que en el caso de MLV. En tal caso, la formación de hexámeros de NTD de VIH-1 sería más críticamente dependiente de las condiciones del ensayo (incluyendo sobre todo la concentración de proteína, pero también la fuerza iónica o el pH), o de la presencia auxiliar de CTD para formar las interfases NTD-CTD que estabilizarían el hexámero. Por lo tanto, decidimos explorar en primer lugar algunas condiciones que pudieran favorecer el desplazamiento del equilibrio monómero-hexámero hacia la formación del oligómero, pero sin utilizar todavía condiciones de aglomeración molecular.

Como punto de partida, se eligieron las condiciones en que NTD de CA de MLV era capaz de hexamerizar (Mortuza, *et al.*, 2004), utilizando una concentración de proteína de 80 μM . La integración de la curva de velocidad de sedimentación obtenida en un experimento de ultracentrifugación analítica reveló la presencia de un pico monodisperso de proteína. La masa molecular calculada a partir del coeficiente de sedimentación obtenido (15.400 Da) fue compatible con la del monómero (16.100 Da) (resultados no mostrados).

Dado que en esas condiciones iniciales no se observó ni siquiera una ligera tendencia a la oligomerización, decidimos ensayar la hexamerización de NTD en condiciones en las que CA es capaz de polimerizar (lo que implica su hexamerización) ((del Alamo y Mateu, 2005); apartado 7 de Materiales y Métodos). El tampón utilizado fue

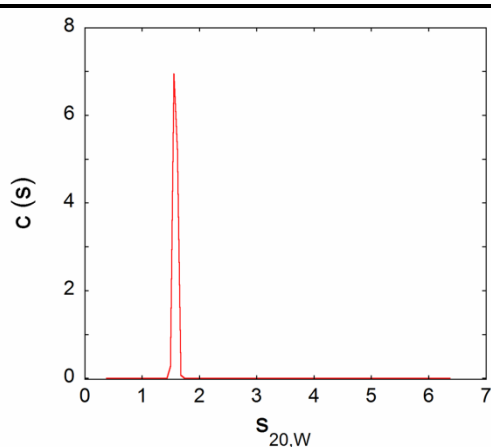


FIGURA 13. Análisis mediante velocidad de sedimentación en ultracentrifugación analítica del estado de oligomerización de NTD en ausencia de aglomeración molecular. Integración de las curvas de velocidad de sedimentación de NTD (80 μM) en 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 1M NaCl. Se representa la concentración de proteína $c(s)$ para cada valor del coeficiente de sedimentación $s_{20,w}$. Se obtiene un pico monodisperso cuyo coeficiente de sedimentación se corresponde con el del monómero de NTD.

50 mM fosfato sódico pH 7,4 y la fuerza iónica muy elevada, conseguida mediante la adición de 1 M NaCl. La concentración de proteína se mantuvo en 80 μ M. Para tener un punto de referencia que nos permitiera detectar cualquier mínima tendencia hacia la hexamerización de NTD en estas mismas condiciones, se utilizaron como control condiciones de baja fuerza iónica (utilizando 150 mM NaCl o ausencia de NaCl), donde se esperaba que no se formase absolutamente nada de hexámero. Los experimentos de velocidad de sedimentación analizados del mismo modo que para las condiciones iniciales ensayadas indican que ni siquiera en presencia de una fuerza iónica elevada (Fig. 13), en condiciones en que CA polimeriza eficazmente, el NTD mostró tendencia alguna a la hexamerización.

Los experimentos anteriores habían utilizado una concentración de proteína no muy elevada, porque esperábamos ver al menos una ligera tendencia hacia la hexamerización. Dado que no ocurrió así, en la siguiente serie de experimentos se forzó al máximo la concentración de proteína, llegando a 1 mM (16 mg/ml). También se elevó aún más la fuerza iónica (utilizando 2,25 M NaCl) para favorecer en lo posible el proceso. De nuevo, para tener un punto de referencia que nos permitiera detectar cualquier mínima tendencia hacia la hexamerización de NTD en función de la concentración de proteína, se utilizaron como control soluciones con concentraciones menores de NTD (33, 100 y 300 μ M). En estas condiciones fueron suficientes concentraciones de CA intacta del orden de 30 μ M para conseguir un ensamblaje eficaz de la cápsida (Fig. 14). Para poder comparar los resultados con los que se describen más adelante en condiciones de aglomeración molecular, se realizaron experimentos de equilibrio de sedimentación en la ultracentrífuga analítica, utilizando velocidades diferentes para alcanzar el equilibrio, como se indica en el apartado 12.2 de Materiales y Métodos.

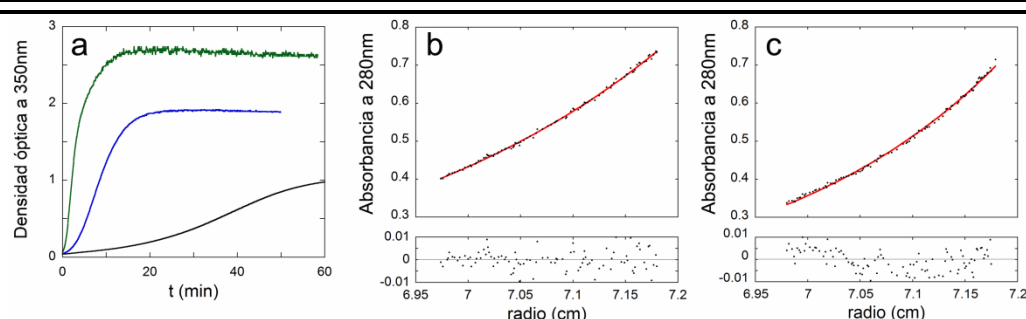


FIGURA 14. Análisis mediante turbidimetría de la polimerización de CA (a) y mediante equilibrio de sedimentación en ultracentrifugación analítica del estado de oligomerización de NTD en ausencia de aglomeración molecular (b, c). (a) La cinética de reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 se siguió mediante la medida de la densidad óptica a 350 nm. Se representa la cinética de la reacción de ensamblaje *in vitro* de CA en 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 2,25 M NaCl con concentraciones de CA de 30 μ M (trazo negro), 40 μ M (trazo azul) y 50 μ M (trazo verde). (b, c) Se muestran las medidas de absorbancia a 280 nm, en función del radio de centrifugación, de NTD a 100 μ M (b) y 1 mM (c) a una velocidad de centrifugación de 20.000 rpm en el mismo tampón utilizado en (a). El análisis de los gradientes de concentración de proteína obtenidos se hizo con el programa HeteroAnalysis, y rindió las masas moleculares que se indican en la Tabla 3.

El análisis de los resultados rindió masas moleculares aparentes promedio (entre 16000 y 18000 Da aproximadamente), iguales a la del monómero de NTD dentro del error experimental. Únicamente a la mayor concentración de NTD ensayada (1 mM), el valor de la masa molecular aparente $M_{w,app}$ resultó algo más elevado, lo que podría indicar una muy ligera tendencia de NTD a oligomerizar, pero la diferencia no fue suficiente como para poder afirmarlo. En la Fig. 14 se muestran las curvas de equilibrio de sedimentación obtenidas a 100 μ M y 1 mM. En la Tabla 3 se resumen los resultados de estos experimentos.

TABLA 3. Masas moleculares aparentes promedio obtenidas en el experimento de velocidad de sedimentación a diferentes concentraciones de NTD y distintas velocidades angulares de centrifugación^a.

[NTD] (mM)	$M_{w,app}^{18000rpm}$ (kDa)	$M_{w,app}^{20000rpm}$ (kDa)
0,33	17,1 \pm 0,1	17,0 \pm 0,1
0,10	16,8 \pm 0,1	17,1 \pm 0,2
0,30	18,1 \pm 0,1	17,2 \pm 0,2
1,00	20,9 \pm 0,3	19,9 \pm 0,2

^a El ajuste de las curvas de equilibrio de sedimentación se realizó con el programa HeteroAnalysis.

La muy elevada concentración de NTD alcanzada en los experimentos anteriores es, sin embargo, algo inferior a la concentración de CA en el virión en maduración, y muy inferior a la actividad química o “concentración efectiva” de CA debida al entorno aglomerado que existe en el virión. Por tanto, consideramos la adición de un agente de aglomeración macromolecular para aumentar la concentración efectiva de NTD y aproximarla sustancialmente a la existente en el virión. De esta manera, esperábamos que se desplazara el equilibrio hacia la formación del hexámero, en el caso de que NTD aislado tuviera una mínima capacidad intrínseca para oligomerizar.

Para evaluar esta posibilidad, se realizó un experimento de equilibrio de sedimentación de NTD a la mayor concentración de proteína ensayada en el experimento anterior (1 mM) y en el mismo tampón (en el que CA completa es capaz de polimerizar), pero utilizando concentraciones crecientes de Ficoll-70 hasta 100g/l como agente aglomerante. En estas condiciones, la concentración efectiva de proteína aumenta varias veces, y es suficiente una concentración de CA de sólo 10 μ M para conseguir un ensamblaje efectivo (Fig. 15a). Ficoll-70 es una macromolécula esencialmente inerte, y ha sido ampliamente utilizada con anterioridad por muchos grupos, incluido el nuestro, para mimetizar el entorno aglomerado de medios fisiológicos en modelos simplificados *in vitro*

(del Alamo, *et al.*, 2005; Du, *et al.*, 2006; Homchaudhuri, *et al.*, 2006; Karimata, *et al.*, 2006; Batra, *et al.*, 2009; Hancock y Hadj-Sahraoui, 2009; Jiao, *et al.*, 2010)

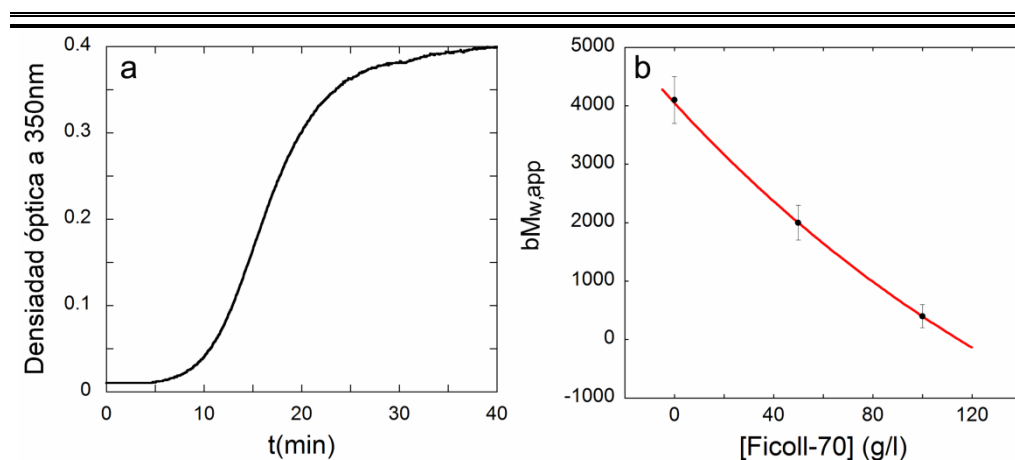


FIGURA 15. Análisis mediante turbidimetría de la polimerización de CA (a) y mediante equilibrio de sedimentación en ultracentrifugación analítica del estado de oligomerización de NTD en condiciones de aglomeración molecular (b). (a) La cinética de reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 se siguió mediante la medida de la densidad óptica a 350 nm, utilizando 10 μ M CA en 50 mM fosfato sódico pH 7,8, 2,25 M NaCl, 100 g/l Ficoll-70 (b) Se muestra la masa molecular aparente de NTD a cada concentración de Ficoll-70, determinada a partir de los gradientes de concentración obtenidos utilizando una concentración total de NTD de 1mM en 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 2,25 M NaCl. Los datos experimentales se han ajustado a un modelo que considera una disolución que contiene una concentración diluida de NTD en una concentración arbitraria de Ficoll-70 (ver texto).

De los gradientes de sedimentación obtenidos mediante ultracentrifugación analítica como se especifica en el apartado 12.3 de Materiales y Métodos se obtuvo la masa molecular de flotación aparente ($bM_{w,app}$) para NTD a cada concentración de Ficoll-70, que se relaciona con la masa molecular de la proteína según la Ec. 22. La masa molecular calculada a partir de $bM_{w,app}$ en ausencia de aglomeración molecular fue compatible con la del monómero de NTD. Para analizar estos datos se representó la masa molecular aparente $bM_{w,app}$ frente a la concentración de Ficoll-70 (Fig. 15b) y el ajuste de los datos se hizo en base a un modelo teórico que considera una disolución que contiene una concentración diluida de la proteína P objeto de estudio (en nuestro caso NTD), en una concentración arbitraria de agente aglomerante F. El modelo utilizado asume que P puede formar oligómeros, con una constante de oligomerización K_n , y que también puede asociar con F para formar complejos P-F, con una constante de heteroasociación K_{pf} . Las interacciones no ideales, relacionadas con la exclusión de volumen, son modeladas utilizando como parámetros de ajuste los volúmenes efectivos de P y F, respectivamente. El modelo que mejor describe los datos experimentales obtenidos no requiere incorporar la oligomerización de P (NTD), de modo que, en estas condiciones, NTD no está formando ningún tipo de asociación. Sin embargo el parámetro correspondiente al volumen efectivo de F es menor que el esperado para el Ficoll-70. En una primera aproximación podría

interpretarse este resultado como que existe algún tipo de interacción entre NTD y el Ficoll-70 que cancela parcialmente los efectos esperados de volumen.

Los resultados anteriores indican que el dominio NTD de CA de VIH-1 no es intrínsecamente capaz de hexamerizar en condiciones que sí permiten la polimerización eficaz de CA intacta; ni siquiera en presencia de agentes de aglomeración molecular que elevarían la concentración efectiva de NTD a varios mmoles/litro, acercándola a la que presenta CA en el interior del virión.

1.2. Efecto de la aglomeración molecular sobre la hexamerización de CA completa con la interfase de dimerización inactivada

Inicialmente se había propuesto que la hexamerización de CA está mediada exclusivamente por el NTD, lo que venía apoyado por el hecho de que el NTD aislado es suficiente para formar hexámeros en el caso de MLV. Sin embargo, más recientemente se ha obtenido evidencia que indica claramente la existencia de interacciones intrahexámero entre el NTD y el CTD de monómeros vecinos en la cápsida madura de VIH-1 (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2007; Pornillos, *et al.*, 2009). Así pues, consideramos la posibilidad de que la presencia de CTD resultara crítica para la hexamerización de CA de VIH-1, por lo que decidimos utilizar la proteína CA completa para los estudios de hexamerización. Para evitar la polimerización de CA introdujimos las mutaciones W184A y M185A. De este modo, la interfase de dimerización CTD-CTD queda esencialmente inactivada, lo que impediría la asociación de los hexámeros que pudieran formarse. El mutante se purificó en forma de monómero y resultó incapaz de dimerizar incluso a concentraciones del orden de mM. Como control adicional se analizó la capacidad de polimerización de este mutante mediante turbidimetría, en condiciones en que CA no mutada polimeriza eficazmente. Los resultados mostraron que, a diferencia de CA no mutada, y como se esperaba, CA W184A/M185A no es capaz de polimerizar de modo apreciable, ni siquiera a fuerza iónica elevada y en presencia de una gran concentración de un agente de aglomeración molecular (Fig. 16a).

A continuación se realizó un experimento paralelo. Por un lado, se ensayó la capacidad de polimerización de CA no mutada mediante turbidimetría. Por otro lado, se ensayó la capacidad de hexamerización de CA W184A/M185A en experimentos de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica. Ambos experimentos se realizaron en solución diluida, en ausencia de aglomeración molecular, exactamente en las mismas condiciones. En las condiciones ensayadas, CA no mutada fue capaz de polimerizar eficazmente incluso a concentraciones tan bajas como 30 μ M (Fig. 14a). Por el contrario, en el caso de CA W184A/M185A la integración de las curvas de velocidad de sedimentación en ultracentrifugación analítica rindió un pico monodisperso, cuya masa molecular calculada a partir del coeficiente de sedimentación obtenido fue en todos los casos compatible con la del monómero. En la Fig. 16b se muestra un ejemplo de una de las integraciones de las curvas de velocidad de sedimentación obtenidas.

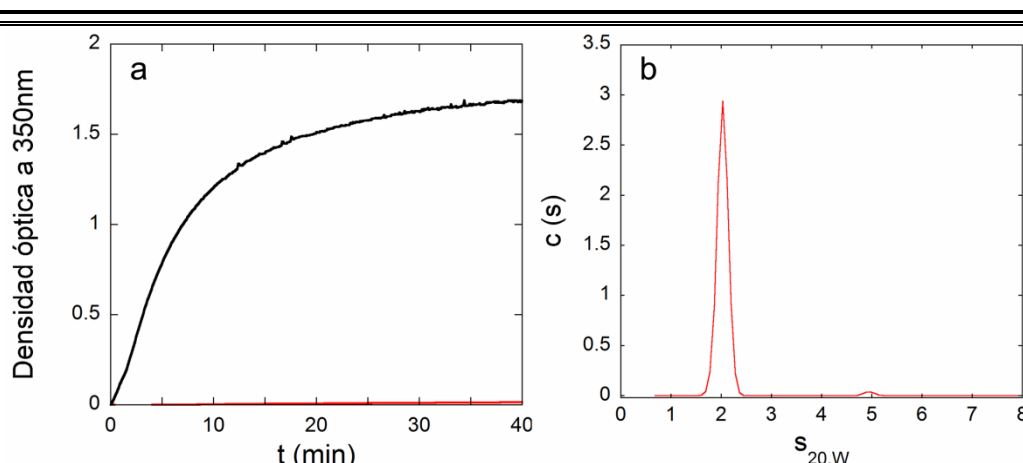


FIGURA 16. Análisis mediante turbidimetría de la polimerización de CA (a) y mediante velocidad de sedimentación en ultracentrifugación analítica del estado de oligomerización del mutante CA-W184A/M185A en ausencia de aglomeración molecular (b). (a) La cinética de la reacción de ensamblaje de partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 se siguió mediante la medida de la densidad óptica a 350nm en función del tiempo. Se utilizó una concentración de CA de 20 μ M en 50mM fosfato sódico pH 7,8, 2,25M NaCl, 100 g/l Ficoll-70. Trazo negro, CA_{wt} utilizada como control positivo; trazo rojo: mutante CA-W184A/M185A con la interfase de dimerización CTD-CTD inactivada. (b). Se utilizó una concentración de CA-W184A/M185A de 100 μ M en 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 2,25M NaCl. Se representa la concentración de proteína c(s) para cada valor del coeficiente de sedimentación $s_{20,w}$. Se obtiene un pico monodisperso cuyo coeficiente de sedimentación se corresponde con el del monómero de CA.

Por tanto, en ausencia de aglomeración molecular y en las condiciones ensayadas (elevada fuerza iónica), CA no mutada es capaz de formar hexámeros y dímeros, requisitos necesarios para la polimerización observada en partículas semejantes a cápsidas maduras. Por el contrario, CA con la interfase de dimerización inactivada no presenta, en las mismas condiciones de ensayo, ninguna tendencia significativa a la formación de hexámeros (o de cualquier tipo de pequeño oligómero).

Al igual que en el caso de NTD aislado, la elevada concentración de CA alcanzada en los experimentos anteriores es, sin embargo, algo inferior a la concentración de CA en el virión en maduración, y muy inferior a la actividad de CA en el entorno aglomerado dentro del virión. Por tanto, incluso en presencia de CTD, la hexamerización podría requerir un entorno aglomerado para alcanzar una suficiente concentración efectiva de CA.

Para evaluar esta posibilidad, se realizó un experimento paralelo en las mismas condiciones que el anterior, excepto que esta vez las reacciones tuvieron lugar en condiciones de aglomeración macromolecular, conseguida mediante la adición de diferentes concentraciones de Ficoll-70 hasta 100g/l, lo que aumentaría varias veces la concentración efectiva de proteína. De nuevo, por un lado se ensayó la capacidad de polimerización de CA no mutada mediante turbidimetría. Por otro lado, se ensayó la capacidad de hexamerización de CA W184A/M185A en experimentos de equilibrio de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica. En ambos casos se utilizaron las

mismas condiciones experimentales. En estas condiciones, CA no mutada fue capaz de polimerizar eficazmente incluso a concentraciones tan bajas como 10 μM (Figura 15a). De los gradientes de sedimentación obtenidos mediante ultracentrifugación analítica como se especifica en el apartado 12.3 de Materiales y Métodos se obtuvo $bM_{w,app}$ para CA W184A/M185A a cada concentración de Ficoll-70. La masa molecular calculada a partir de $bM_{w,app}$ en ausencia de aglomeración molecular fue compatible con la del monómero de CA W184A/M185A. Los datos se analizaron como se hizo para NTD, ajustándolos al mismo modelo teórico (ver más arriba) (Fig. 17). Al igual que en el caso de NTD, el modelo que mejor describe los datos experimentales obtenidos no requiere incorporar la oligomerización de CA W184A/M185A, de modo que, en estas condiciones, este mutante no está formando ningún tipo de asociación. También en esta ocasión el parámetro correspondiente al volumen efectivo de F es menor que el esperado para el Ficoll-70, lo que sugiere que se establece algún tipo de interacción entre CA W184A/M185A y el Ficoll-70.

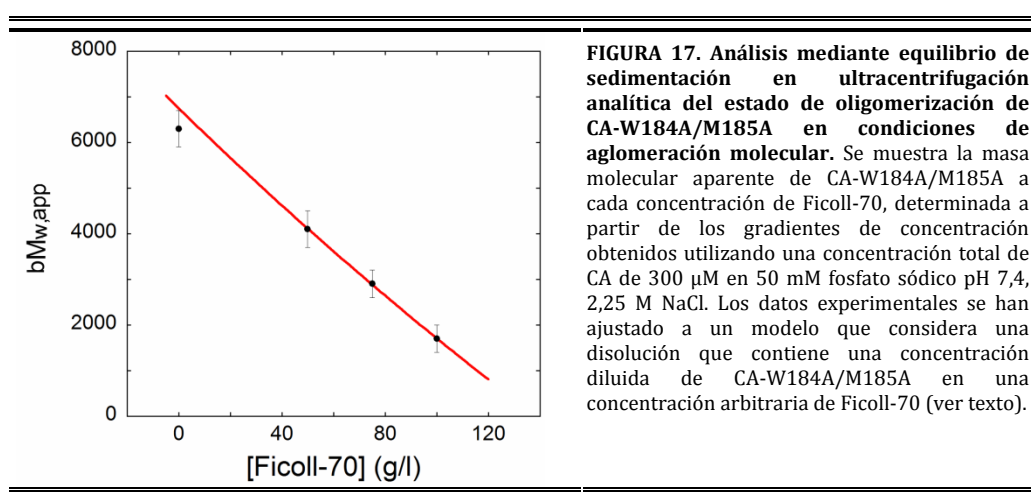


FIGURA 17. Análisis mediante equilibrio de sedimentación en ultracentrifugación analítica del estado de oligomerización de CA-W184A/M185A en condiciones de aglomeración molecular. Se muestra la masa molecular aparente de CA-W184A/M185A a cada concentración de Ficoll-70, determinada a partir de los gradientes de concentración obtenidos utilizando una concentración total de CA de 300 μM en 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 2,25 M NaCl. Los datos experimentales se han ajustado a un modelo que considera una disolución que contiene una concentración diluida de CA-W184A/M185A en una concentración arbitraria de Ficoll-70 (ver texto).

Estos resultados indican que CA con la interfase de dimerización inactivada no presenta una tendencia significativa hacia la hexamerización, ni siquiera en condiciones de aglomeración molecular que elevarían la concentración efectiva de CA a varios mmoles/litro (acercándola a la que presenta en el interior del virión), que permiten la polimerización eficaz de CA sin mutaciones en partículas semejantes a cápsidas maduras. Por tanto, la dimerización de CA a través de CTD es un paso previo imprescindible para la formación de hexámeros durante la formación de la cápsida madura de VIH-1.

2. Efecto de la aglomeración molecular en la inhibición del ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1 por moléculas pequeñas

Uno de los intereses de nuestro laboratorio es el diseño de inhibidores de ensamblaje de cápsidas víricas (ver apartado 3 de Resultados). En la identificación de cualquier potencial inhibidor de un proceso de infección viral, la evaluación inicial se realiza en muchas ocasiones *in vitro* o *ex vivo* en solución diluida. Este es el caso, por ejemplo, de los inhibidores de la cápsida de VIH-1 identificados mediante cribado de peptidotecas o quimiotecas. Sin embargo la acción fisiológica, *in vivo*, de estos potenciales compuestos antivirales ocurre en medios aglomerados.

Una predicción de la teoría de aglomeración molecular es que la inhibición de procesos de asociación entre macromoléculas por una molécula de pequeño tamaño puede verse reducida en medios aglomerados como son los fisiológicos (Minton, 1993). De modo simplificado, en un entorno con una elevada concentración de macromoléculas inertes, el coeficiente de actividad de cada especie molecular será función de la composición total del medio. Considerando un equilibrio de unión entre dos moléculas, cuanto mayor sea el tamaño de dichas moléculas, mayor será el incremento de la constante de afinidad en un entorno aglomerado con respecto a una solución diluida. En una competición entre dos ligandos para unirse a un mismo sitio, se verá favorecido el ligando de mayor tamaño (ver apartado 7 de Introducción). En esencia, esta importante predicción no había sido comprobada experimentalmente, y se desconocía completamente si podría tener validez en determinados procesos virales que implican asociación de macromoléculas, como es la unión del virión a su receptor celular, o el proceso de ensamblaje de la cápsida.

Como un segundo objetivo del presente estudio, nos planteamos investigar experimentalmente esta predicción de la teoría de medios aglomerados, utilizando como sistema modelo la inhibición del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 por el dominio CTD aislado o por el dodecapéptido CAI (Sticht, *et al.*, 2005). CTD y CAI son capaces de inhibir eficazmente en un medio relativamente diluido *in vitro* la polimerización de CA de VIH-1 en partículas semejantes a cápsidas (Lanman, *et al.*, 2002; del Alamo y Mateu, 2005; Sticht, *et al.*, 2005). Aunque hay bastante diferencia de tamaño entre CTD y CAI, ambos son de un tamaño relativamente pequeño con respecto a la molécula competida, CA completa, especialmente porque durante el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 las unidades estructurales que se asocian entre sí para formar la cápsida parecen ser oligómeros de CA compuestos por un cierto número de subunidades (Barklis, *et al.*, 2009). Para el diseño de experimentos e interpretación de resultados a la luz de la teoría de aglomeración molecular se contó con la colaboración del Prof. Germán Rivas.

En los experimentos se determinó la actividad inhibitoria de CTD o CAI sobre la cinética de polimerización de CA de VIH-1 *in vitro* para formar partículas similares a

cápsidas. La actividad inhibitoria obtenida en ausencia de aglomeración molecular se comparó con la actividad obtenida en un entorno aglomerado, manteniendo idénticas el resto de condiciones, incluyendo una elevada fuerza iónica. Esto permitía comparar el efecto específico de la ausencia o presencia del aglomerante sobre la capacidad inhibitoria de los compuestos ensayados. Para conseguir este entorno aglomerado se utilizó una elevada concentración de Ficoll-70 o en algún caso de Dextrano T-40. Como el Ficoll-70, Dextrano T-40 es una macromolécula esencialmente inerte, y ha sido ampliamente utilizada con anterioridad para mimetizar el entorno aglomerado de medios fisiológicos en modelos simplificados *in vitro* (Dominak, *et al.*; Pastor, *et al.*; Du, *et al.*, 2006; Homchaudhuri, *et al.*, 2006; Karimata, *et al.*, 2006; Buczek, *et al.*, 2007; Dominak y Keating, 2008; Batra, *et al.*, 2009; Hancock y Hady-Sahraoui, 2009; Jiao, *et al.*, 2010).

El ensamblaje *in vitro* de la cápsida se realizó como se indica en el apartado 7 de Materiales y Métodos. La cinética de ensamblaje de la cápsida en ausencia de inhibidor o en presencia de concentraciones crecientes de CTD o CAI se siguió de modo cuantitativo mediante turbidimetría. En las figuras 18 y 19 se muestra el efecto de inhibición de la polimerización *in vitro* de CA por parte de CTD y CAI utilizando diferentes relaciones molares inhibidor:CA y en ausencia (paneles izquierdos de la Figura 18) o presencia (paneles derechos de la Figura 18) de Ficoll-70 como agente de aglomeración macromolecular. Como control negativo de inhibición se utilizó un péptido de similar tamaño a CAI y que no redujo ni la velocidad de polimerización de CA ni la cantidad de cápsida ensamblada (resultados no mostrados).

En solución diluida (ausencia de agentes de aglomeración molecular), la adición de cantidades crecientes de CTD (Fig. 18a) o CAI (Fig. 18c) condujo como se esperaba a tasas de polimerización (k_p) de CA decrecientes y también a una disminución gradual en la cantidad de cápsida ensamblada (indicada por el máximo estable de densidad óptica (OD_m) en las curvas de polimerización). Por ejemplo, a una relación CTD:CA de 2, el cociente entre las tasas de polimerización en presencia y ausencia de inhibidor, k_{pi}/k_{p0} fue de 0.2 (aproximadamente), y el cociente entre las cantidades de cápsida ensamblada OD_{mi}/OD_{m0} fue de 0.5 (Fig. 18a y Fig.19). En el caso de CAI, a una relación CAI:CA de sólo 0,5 tanto k_{pi}/k_{p0} como OD_{mi}/OD_{m0} rindieron valores inferiores a 0,1 (Fig. 18c y Fig. 19). Por tanto, confirmamos que en ausencia de aglomeración molecular, CTD y CAI se comportan como inhibidores eficientes del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 en nuestro modelo de ensayo.

En condiciones de aglomeración molecular conseguidas mediante la adición de Ficoll-70 a una concentración final de 100 g/l y en ausencia de inhibidores, la cantidad total de cápsida fue similar a la obtenida en solución diluida, como indican los valores de OD_m obtenidos (Fig. 18). Sin embargo, la adición del agente aglomerante produjo un aumento muy notable en la tasa de polimerización (Fig.18). El mismo aumento de la tasa de polimerización se observó en presencia de inhibidores, tanto de CTD (Fig. 18b) como de CAI (Fig. 18d).

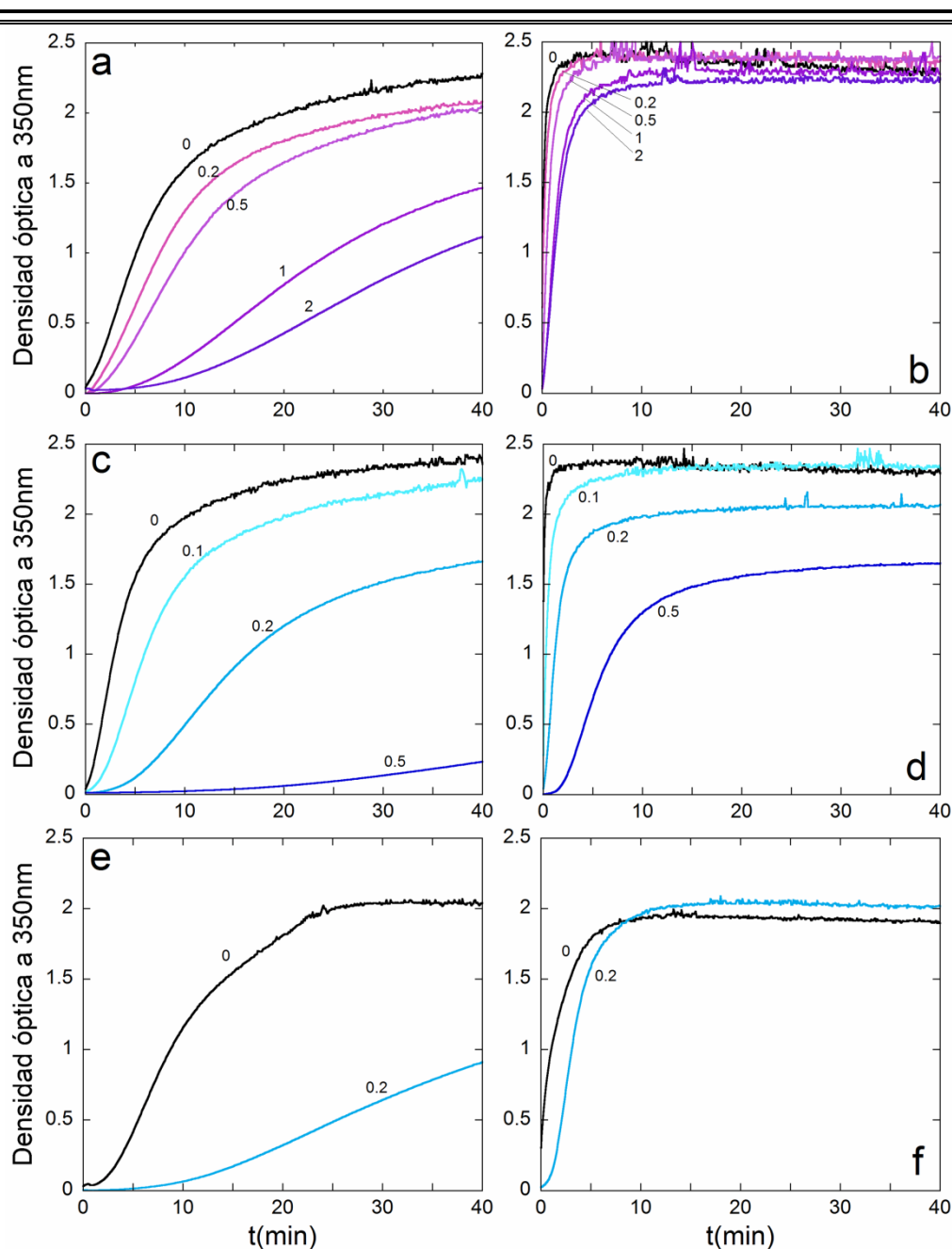


FIGURA 18. Efecto de la aglomeración molecular en la inhibición de la polimerización de CA por CTD o por el péptido CAI. La cinética de la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 se siguió mediante la medida de la densidad óptica a 350nm en función del tiempo. (a, b) Inhibición de la polimerización de CA por CTD en ausencia (a) o presencia (b) de 100g/l de Ficoll-70 como agente inerte de aglomeración molecular. (c, d) Inhibición por el péptido CAI en ausencia (c) o presencia (d) de 100 g/l de Ficoll-70. (e, f) Inhibición por el péptido CAI en ausencia (e) o presencia (f) de 50 g/l de dextrano T40. Se utilizó una concentración de CA de 46 μ M en 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 2,25 M NaCl. En cada panel se indica la relación

molar inhibidor: CA utilizada (entre 0 y 2). En cada panel se muestra un experimento representativo.

A pesar de este incremento generalizado en la eficacia del proceso de ensamblaje en un entorno aglomerado, cuando se compararon las actividades inhibitorias de CTD o CAI, se observó que ambas habían sido fuertemente reducidas en presencia de Ficoll-70, con respecto a las determinadas en ausencia de Ficoll. En términos generales, en presencia de cualquiera de los inhibidores, a cualquier relación inhibidor:CA, la adición del agente de aglomeración molecular duplicó el cociente k_{pi}/k_{p0} (Fig. 19), y provocó asimismo un aumento notable del cociente OD_{mi}/OD_{m0} (Fig. 18). Por ejemplo, a una relación CTD:CA de 2 el cociente OD_{mi}/OD_{m0} aumentó de 0,5 en ausencia de Ficoll a alrededor de 0,9 en presencia de Ficoll, lo que corresponde a una reducción en la inhibición por CTD desde un 50% a sólo un 10%. En el caso de CAI, a una relación CAI:CA de 0,5 el cociente OD_{mi}/OD_{m0} aumentó de 0,1 en ausencia de Ficoll a 0,7 aproximadamente en presencia de Ficoll, lo que corresponde a una reducción de la inhibición por CAI desde un 90% a sólo un 30%.

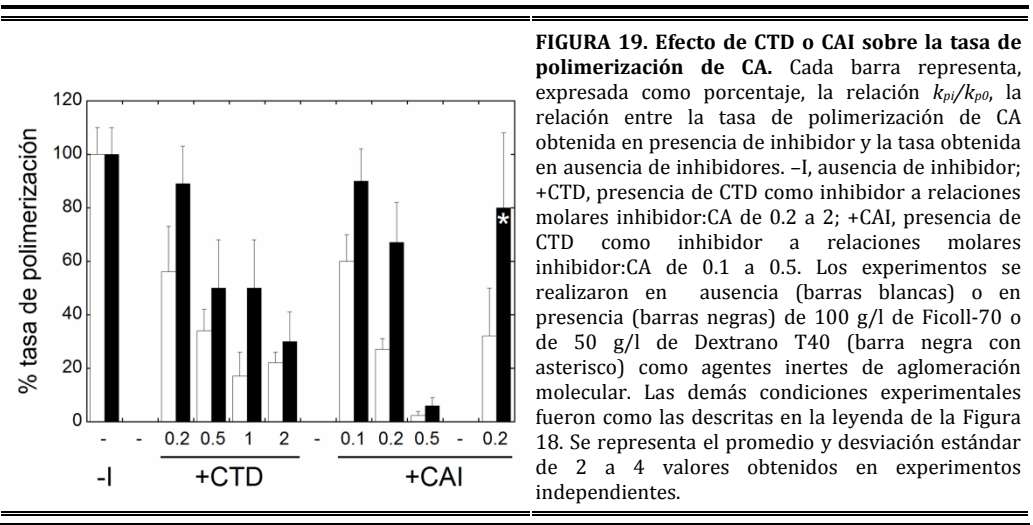


FIGURA 19. Efecto de CTD o CAI sobre la tasa de polimerización de CA. Cada barra representa, expresada como porcentaje, la relación k_{pi}/k_{p0} , la relación entre la tasa de polimerización de CA obtenida en presencia de inhibidor y la tasa obtenida en ausencia de inhibidores. -I, ausencia de inhibidor; +CTD, presencia de CTD como inhibidor a relaciones molares inhibidor:CA de 0.2 a 2; +CAI, presencia de CTD como inhibidor a relaciones molares inhibidor:CA de 0.1 a 0.5. Los experimentos se realizaron en ausencia (barras blancas) o en presencia (barras negras) de 100 g/l de Ficoll-70 o de 50 g/l de Dextrano T40 (barra negra con asterisco) como agentes inertes de aglomeración molecular. Las demás condiciones experimentales fueron como las descritas en la leyenda de la Figura 18. Se representa el promedio y desviación estándar de 2 a 4 valores obtenidos en experimentos independientes.

Para comprobar que el efecto del Ficoll-70 no era específico de esta macromolécula, se utilizó Dextrano T-40 como agente aglomerante inerte no relacionado, en el mismo tipo de ensayos de inhibición por CAI del ensamblaje de la cápsida. Los resultados fueron similares a los obtenidos con Ficoll (Figs. 18e y 18f). Por ejemplo, a una relación molar CAI:CA de 0.2 el cociente OD_{mi}/OD_{m0} aumentó de 0,5 en ausencia de dextrano a alrededor de 1 en su presencia. Esto corresponde a una reducción de la inhibición por CAI desde un 50% a esencialmente 0% (no inhibición en absoluto). Por tanto, la reducción observada en la capacidad inhibitoria de pequeñas moléculas como el péptido CAI sobre el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 no depende de la naturaleza del agente de aglomeración molecular, sino que es debida al propio entorno aglomerado.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que, como había sido predicho por la teoría, en presencia de aglomeración macromolecular la capacidad de moléculas relativamente pequeñas para inhibir el ensamblaje de una cápsida vírica a partir de subunidades de proteína resulta considerablemente disminuida.

3. Diseño racional y caracterización de compuestos peptídicos y no peptídicos como inhibidores del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1

Las terapias actuales contra VIH implican el uso de cócteles de fármacos dirigidos a interferir en distintos procesos del ciclo viral. Sin embargo, aún no existen fármacos que interfieran con el ensamblaje de la cápsida del virus. Este tipo de inhibidores podría constituir un complemento muy relevante a los actualmente existentes, para reducir la aparición de variantes resistentes a las actuales terapias combinadas.

En los últimos años se han identificado, a partir de quimiotecas o peptidotecas, algunas moléculas pequeñas capaces de inhibir el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 (apartado 6 de Introducción). Como aproximación alternativa y tercer objetivo de este trabajo hemos realizado, en estrecha colaboración con el Prof. José Luis Neira y su grupo, el diseño o modificación racional y análisis de compuestos, especialmente péptidos, capaces de inhibir el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 mediante interferencia con la asociación de CA a través de una o más de las interfases de oligomerización observadas en la estructura de la cápsida madura. Para algunos aspectos concretos se contó con la colaboración de otros investigadores. La Lda. Alicia Rodríguez y la Dra. Inmaculada López de nuestro equipo participaron fundamentalmente en algunos experimentos de inhibición de ensamblaje y en la puesta a punto del sistema de transporte de péptidos al interior celular. El Dr. Miguel Ángel Martínez y la Dra. María Nevot de su equipo realizaron los ensayos de infectividad, y el Dr. Claudio Cavasotto realizó algunos análisis teóricos encaminados a mejorar las propiedades de un péptido inhibidor del ensamblaje.

Para el ensayo de potenciales inhibidores de ensamblaje de la cápsida de VIH-1 diseñados, modificados y/o caracterizados en el presente estudio era preciso primero definir unas condiciones estándar de polimerización de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras. En nuestro laboratorio desarrollamos un sistema de ensamblaje *in vitro* en condiciones de aglomeración molecular que permiten el correcto ensamblaje de partículas semejantes a cápsidas en condiciones de baja fuerza iónica y actividad química de CA que se aproximan a las fisiológicas (del Alamo, *et al.*, 2005). Sin embargo, en estas condiciones las elevadísimas concentraciones de CA y de inhibidores necesarias para llevar a cabo los experimentos en este sistema de ensamblaje habrían sido prohibitivas para el número de experimentos necesario. Por tanto, en los ensayos de ensamblaje estándar realizados en esta tesis se ha utilizado un agente de aglomeración molecular, Ficoll-70, a elevada concentración para mimetizar de modo simplificado el entorno aglomerado existente en el virión de VIH-1 en condiciones fisiológicas, pero se han

realizado a fuerza iónica elevada para poder utilizar concentraciones menores de CA y de los compuestos potencialmente inhibidores.

3.1. Inhibición por dendrímeros orgánicos del ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1

El Prof. J.L.Neira ha venido diseñando y ensayando en colaboración con nosotros diferentes compuestos de pequeño tamaño, tanto peptídicos como no peptídicos capaces de unirse al dominio CTD de CA de VIH-1. Estos compuestos presentan un interés básico para estudios estructurales y termodinámicos del reconocimiento molecular proteína-ligando, y los determinantes de la auto-asociación de CA durante el ensamblaje de la cápsida de VIH-1. Además, constituyen potenciales inhibidores del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 y podrían servir como modelos o cabezas de serie para el diseño de nuevos agentes antivirales. En particular, el Dr. Neira demostró que algunos dendrímeros derivados del ácido gálico-trietilén glicol (GATG) son capaces de unirse a CTD, siendo su epítipo de unión parcialmente solapante con la interfase de dimerización (concretamente se unen a los residuos E180, W184, T188 y K203), y siendo su afinidad por CTD similar a la afinidad de dimerización CTD-CTD (Domenech, *et al.*, 2010). Nosotros hemos ensayado si alguno de estos dendrímeros es capaz de inhibir el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1.

Los dendrímeros que, en base a los resultados de asociación con CTD, resultaban en principio más prometedores como potenciales inhibidores del ensamblaje de CA (Tabla 4) se probaron en nuestro ensayo estándar de inhibición de la polimerización de CA en presencia de agentes de aglomeración molecular. Todos menos uno de los 7 dendrímeros ensayados resultaron completamente inactivos en la inhibición del ensamblaje, incluso a las mayores concentraciones de dendrímeros testadas (un exceso de más de diez veces sobre la concentración de CA). Sin embargo, el dendrímero denominado G1-Benzoato (Tabla 4) sí resultó capaz de inhibir en cierta medida el ensamblaje *in vitro* de la cápsida de VIH-1. (Fig. 20b y 20c).

TABLA 4. Masa molecular (M) y constante de equilibrio de disociación ligando-CTD (K_{dis}) para los dendrímeros ensayados.

Dendrímero	M (kDa)	K_{dis} (μ M) ^a
[G1]-NH ₂	0,604	8,3
[G1]-Lac ^c	1,85	ND ^b
[G1]-OSO ₃ Na	1,20	1,3
PEG-[G1]-OSO ₃ Na	6,34	5,2
[G1]-Man	1,29	303
[G1]-SO ₃ Na ^c	2,03	ND ^b

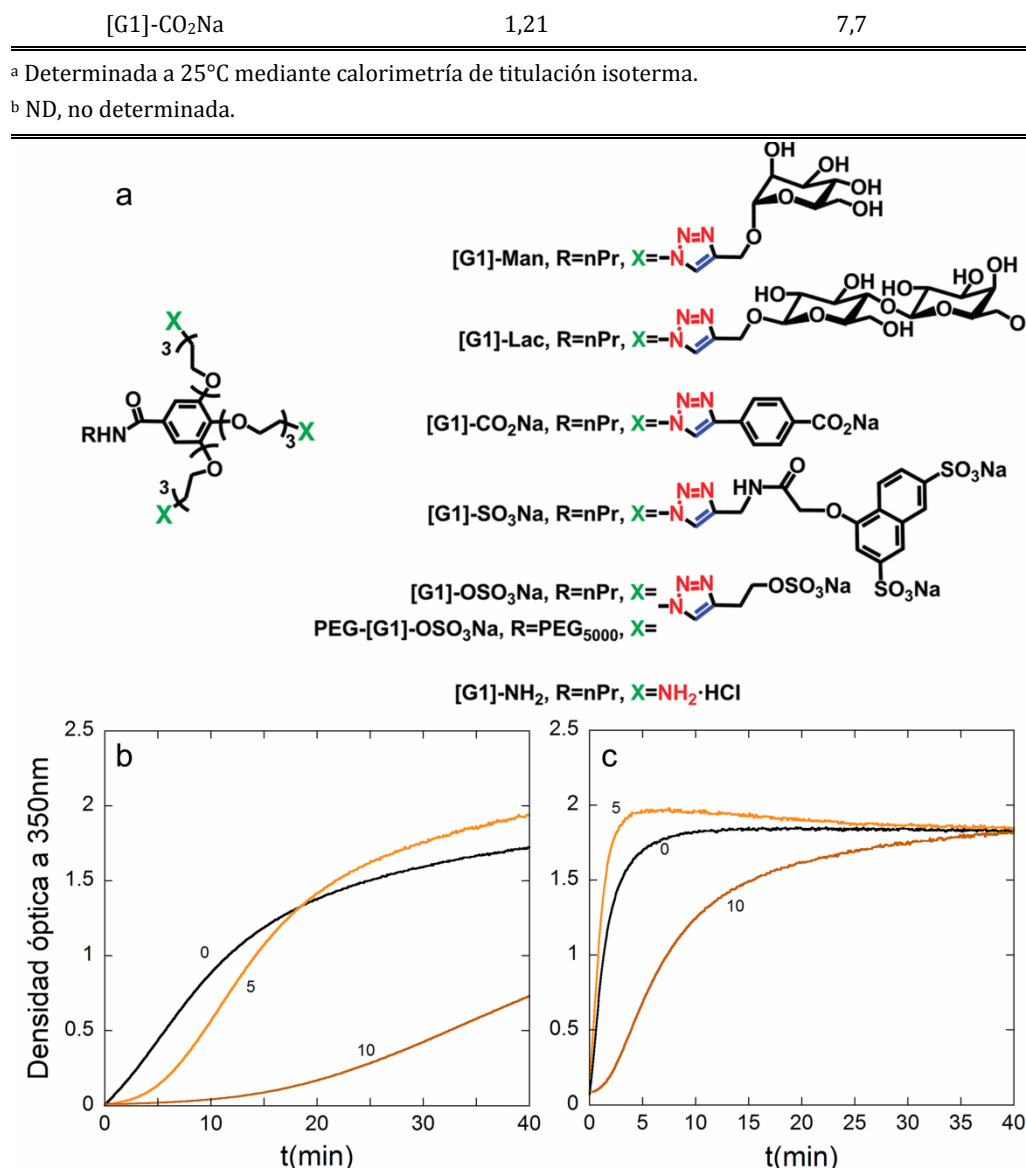


FIGURA 20. Inhibición de la polimerización de CA por dendrímeros. (a) Estructura química de los diferentes compuestos dendriméricos ensayados. (b, c) La cinética de la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 se siguió mediante la medida de la densidad óptica a 350nm en función del tiempo. Se utilizó una concentración de CA de 46 μM en 50 mM fosfato sódico pH 7,8, 2,25M NaCl en solución diluida (b) o en presencia de Ficoll-70 a 100 g/l (c), en ausencia o en presencia del dendrímero G1-Benzoato (etiquetado en el panel (a) como [G1]-CO₂Na). Las relaciones molares dendrímero:CA utilizadas se indican junto a cada curva. Se muestra un experimento representativo cuyos resultados se han reproducido en experimentos independientes.

No obstante, la relación molar G1-Benzoato:CA necesaria para inhibir la polimerización resultó ser muy elevada, para una inhibición de en torno al 65% se

necesitó una relación molar dendrímero:CA de 10. Por lo tanto, se consideró que una caracterización adicional de estos compuestos, incluyendo su posible capacidad para inhibir *ex vivo* la infección por VIH-1, deberían esperar a que se realizaran modificaciones químicas adicionales en su estructura que aumentaran su capacidad de inhibir *in vitro* el ensamblaje de la cápsida.

3.2. Inhibición por el péptido CAC1 (hélice 9 de CA) del ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1

El péptido CAC1 fue diseñado por el Dr. Neira dentro de una colaboración con nuestro grupo a partir de datos estructurales y de nuestro análisis termodinámico de los residuos energéticamente implicados en la interacción CTD-CTD. Este péptido reproduce la secuencia de la hélice α 9 de CA, que contiene la gran mayoría de los residuos energéticamente implicados en el reconocimiento CTD-CTD (apartado 3.1 de la Introducción). Resultados de ambos grupos usando diferentes técnicas mostraron que CAC1 es capaz de unirse a CTD con una afinidad que es sólo cinco veces menor que la de homodimerización CTD-CTD, con una K_{dis} de heterodimerización CAC1-CTD de aproximadamente 50 μ M, frente a 10 μ M la de homodimerización de CTD (Garzon, *et al.*, 2004).

Mapeo del sitio de unión del péptido CAC1 en el dominio CTD. Como parte de este estudio, el Prof. Neira realizó en colaboración con nosotros la localización del sitio de unión de CAC1 en el dominio CTD en forma de monómero, utilizando la técnica de espectroscopía RMN para la obtención de espectros HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*). En este tipo de análisis se observan señales correspondientes a los protones amídicos, correspondiendo cada señal a un residuo aminoacídico de la proteína. Cambios en una señal en respuesta a la unión de un ligando indican que el residuo correspondiente está implicado de algún modo en la interacción con el ligando. Para el mapeo se decidió utilizar el monómero de CTD por una serie de razones: i) para presentar de modo accesible el sitio de unión de CAC1, dado que se esperaba que interaccionara con la interfase de dimerización; ii) para facilitar la asignación de señales; y iii) para facilitar la comparación con los resultados del mapeo del péptido combinatorial CAI y su derivado NYAD-1 sobre CTD (Ternois, *et al.*, 2005; Bhattacharya, *et al.*, 2008).

Puesto que CTD no es estable como monómero, se utilizó el mutante CTD W184A. Nuestros resultados previos mostraron que este mutante no dimeriza ni siquiera a concentraciones elevadas, pero mimetiza fielmente la conformación del intermediario monomérico (inestable) del proceso de dimerización de CTD no mutado (Mateu, 2002; Alcaraz, *et al.*, 2007). Por tanto, realizamos el necesario marcaje con ^{15}N y purificamos el dominio CTD W184A marcado para su análisis espectroscópico mediante HSQC. Los residuos de CTD cuyas señales en espectros HSQC mostraron las mayores variaciones al unirse el péptido CAC1 se indican en la Fig. 21c. Estos residuos se encontrarán en el sitio de unión de CAC1 en CTD, o cercanos a él. De acuerdo con este criterio, y como se

esperaba, el sitio de unión de CAC1 en el monómero de CTD solapa de forma extensa con la interfase de dimerización CTD-CTD (comparar Figs. 21b y 21c). En particular, los residuos 184, 185, 188 localizados en la parte central de la hélice 9, y también los residuos 150, 154, 190, 200 y 203 se encuentran formando parte o cerca del sitio de unión de CAC1 y de la interfase de dimerización CTD-CTD.

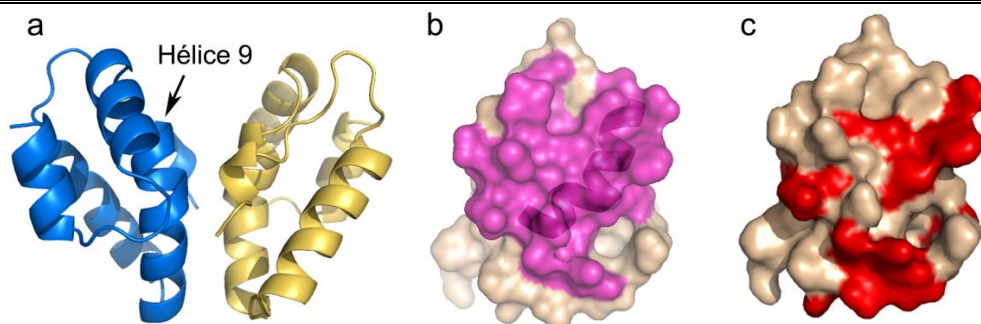


FIGURA 21. Mapeo del epítipo de contacto del péptido CAC1 en CTD. (a) Modelo de cintas de la estructura tridimensional del dímero de CTD (Worthylake, *et al.*, 1999). Se identifica la hélice 9. (b) Estructura de superficie de un monómero aislado de CTD, representado en la misma orientación que en la Figura 6. Se indican, en color magenta, los residuos que participan en la interfase CTD-CTD (del Alamo, *et al.*, 2003). La hélice 9 aparece resaltada en un modelo de cinta. (c) Estructura del mismo monómero de CTD en la misma orientación que en (b), en la que se indica, en color rojo, el sitio de unión del péptido CAC1 en CTD, definido en base a los resultados de experimentos HSQC (ver texto).

Inhibición por el péptido CAC1 del ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1. Los resultados obtenidos demostraban que CAC1 se une a CTD con una afinidad comparable a CTD, y que los sitios de unión en ambos casos son fuertemente solapantes. Por tanto, era posible que CAC1 fuera capaz de inhibir eficazmente la polimerización de CA para formar cápsidas maduras de VIH-1.

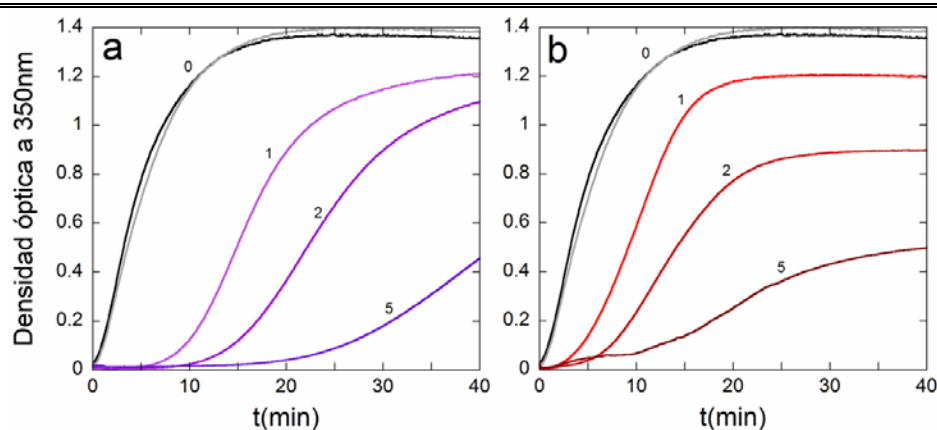


FIGURA 22. Inhibición de la polimerización de CA por CTD y por el péptido CAC1. Se siguió la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 mediante la medida de la densidad óptica a 350nm. (a) Inhibición por CTD. (b) Inhibición por el péptido CAC1. Se utilizó una concentración de CA de 20 μ M en 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 2,25 M NaCl, 100 g/l Ficoll-70. En cada panel se indica la relación

molar inhibidor:CA utilizada (entre 0 y 10), y se muestra además la cinética de polimerización de CA en presencia de un péptido sin actividad inhibidora a una relación molar péptido:CA de 10 (curva gris). En cada panel se muestra un experimento representativo cuyos resultados se han reproducido en experimentos independientes.

Se utilizó el dominio CTD completo como referencia para comparar la potencia inhibidora de CAC1 sobre la polimerización de CA *in vitro* para formar partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 en condiciones de aglomeración molecular, utilizando nuestro ensayo estándar. Como control negativo se utilizó un péptido de longitud similar que no se une a CTD. Este péptido no mostró actividad inhibitoria alguna sobre la polimerización de CA, incluso a una relación molar péptido:CA muy elevada (Fig. 22). Por el contrario, el péptido CAC1 fue capaz de inhibir el ensamblaje de la cápsida con una eficacia que se aproximó a la del dominio CTD completo (Fig. 22).

La capacidad inhibitoria del péptido CAC1 se evaluó a continuación en ausencia de agentes de aglomeración molecular (Fig. 23). Como se esperaba, la tasa de polimerización y la cantidad de cápsida ensamblada se redujeron drásticamente con respecto a lo obtenido en un entorno aglomerado (del Alamo, *et al.*, 2005), pero la utilización de una mayor concentración de CA permitió restaurar un ensamblaje eficiente. En estas condiciones se confirmó la actividad inhibitoria de CAC1 sobre el ensamblaje. Como se esperaba del estudio descrito en el apartado 2 de Resultados, la capacidad inhibitoria de CAC1 sobre el ensamblaje de la cápsida en solución diluida fue mayor que en un entorno aglomerado. Por ejemplo, la reducción en la tasa de inhibición en presencia de Ficoll-70 es de en torno al 40% con una relación CAC1:CA de 5, mientras que en solución diluida se alcanza una reducción similar con una relación CAC1:CA de sólo 2.

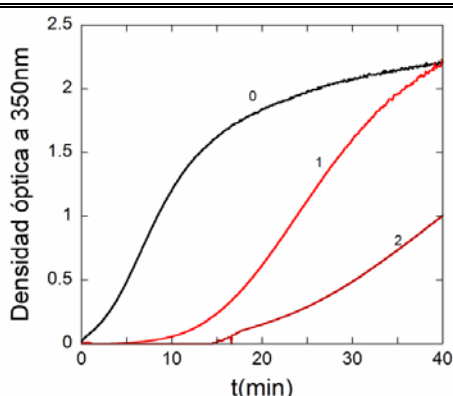


FIGURA 23. Inhibición de la polimerización de CA en solución diluida por el péptido CAC1. Se siguió la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 mediante la medida de la densidad óptica a 350nm en función del tiempo, en ausencia (trazo negro) o en presencia de péptido CAC1 (trazos rojos) a las relaciones molares CAC1:CA indicadas en la figura. Se utilizó una concentración de CA de 46μM en 50 mM fosfato sódico pH 7,4, 2,25 M NaCl, en ausencia de agentes de aglomeración molecular. Se muestra un experimento representativo cuyos resultados se han reproducido en experimentos independientes.

En resumen, el péptido CAC1, que reproduce la secuencia de la hélice 9 de CA de VIH-1, se une a una región de CTD fuertemente solapante con la interfase de dimerización CTD-CTD en la cápsida madura, y es capaz de inhibir casi tan eficazmente como el dominio CTD completo el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1. CAC1 representa, pues, un compuesto de tamaño relativamente pequeño que es capaz de actuar como inhibidor interfásico del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1.

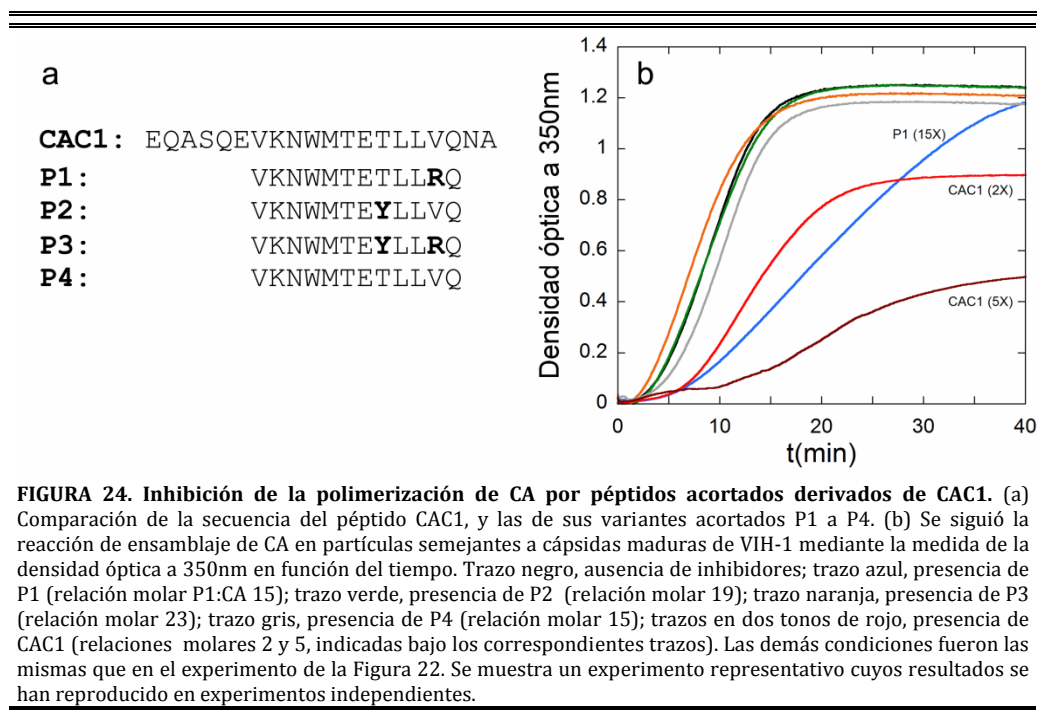
3.3. Modificación racional del péptido CAC1 para reducir su tamaño sin eliminar su actividad inhibidora sobre el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1

Partiendo del péptido CAC1 como cabeza de serie, el grupo del Prof. J.L.Neira y el nuestro decidimos realizar en colaboración diferentes modificaciones racionales en su longitud y secuencia, encaminadas a tratar de mejorar sus propiedades como inhibidor del ensamblaje de la cápsida de VIH-1. Idealmente era deseable obtener un péptido inhibidor derivado de CAC1 que fuera más soluble, más pequeño y/o más potente.

Una aproximación para tratar de reducir el tamaño de CAC1 sin reducir sustancialmente su actividad inhibidora del ensamblaje de la cápsida fue iniciada por el Prof. J.L.Neira, mediante la eliminación de algunos residuos de los extremos N- y C-terminales de CAC1. En primer lugar, el acortamiento del péptido permitiría a su grupo estudiar determinados aspectos del reconocimiento CTD-péptido; además, la disponibilidad de un péptido de menor tamaño podría facilitar su utilización en futuros experimentos de inhibición de la infección por VIH-1. El acortamiento del péptido dejaría necesariamente fuera algunos de los residuos de la hélice 9 de CTD que estudios previos de nuestro grupo demostraron que eran energéticamente importantes para la dimerización (del Alamo, *et al.*, 2003). No obstante, el mapeo de CAC1 sobre CTD había demostrado que la interacción CAC1-CTD no es idéntica a la interacción CTD-CTD, y la contribución energética de algunos residuos podría no ser la misma en ambos casos. Además, el análisis teórico indicaba que la eliminación de algunos residuos en ambos extremos, junto a la sustitución de alguno de los restantes (entre los no críticamente implicados en la interfase de dimerización) podría aumentar la baja propensión helicoidal del péptido en solución. De este modo sería en principio posible reducir el coste entrópico de la asociación CTD-péptido, lo que podría compensar parcialmente la esperada pérdida de afinidad debida a la ausencia de algunos residuos de CAC1 energéticamente importantes para la interacción.

De acuerdo con estos principios de diseño, se sintetizaron cuatro péptidos derivados de CAC1, denominados P1 a P4 (Fig. 24a), y el equipo del Prof. Neira determinó, tanto mediante cromatografía de filtración en gel como en ensayos de desnaturalización térmica seguida mediante DC, que todos ellos son capaces de unirse a CTD, con afinidades cercanas a la de homodimerización CTD-CTD (Doménech *et al.*, resultados no publicados). A continuación el Prof. Neira determinó mediante espectroscopía HSQC, del mismo modo indicado para CAC1 en el apartado anterior, la región aproximada en CTD donde estos péptidos se unen. Los resultados de mapeo indican que únicamente el péptido P1 se une a residuos que forman parte de la interfase de dimerización CTD-CTD, mientras que los otros tres se unen a una zona más cercana al C-terminal de CTD (Doménech *et al.*, resultados no publicados).

Nosotros hemos analizado la capacidad inhibitoria de estos cuatro péptidos sobre el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1 (Fig. 24b). Como esperábamos de los resultados del mapeo de los péptidos sobre CTD, de los cuatro péptidos acortados, sólo P1 resultó capaz de inhibir en cierta medida el ensamblaje *in vitro* de CA, siendo la inhibición, en todo caso, mucho menor que la de CAC1 a relaciones molares comparables. En el experimento de la Fig. 24b, fue necesaria una relación molar péptido:CA de 16 para conseguir una reducción de la tasa de polimerización del 65%. Como comparación, con el péptido CAC1 se consiguió una reducción similar de la tasa de polimerización utilizando una relación péptido:CA de 2 o sólo algo superior. Es decir, P1 resultó un inhibidor aproximadamente un orden de magnitud menos potente que CAC1.



Los resultados de mapeo de los péptidos P1 a P4 obtenidos por el Dr. Neira ponen de manifiesto la facilidad con la que el sitio de unión de estas moléculas en el dominio CTD puede variar en función de un acortamiento o cambios de secuencia. Nuestros resultados de inhibición de ensamblaje *in vitro* de la cápsida de VIH-1 por estos péptidos indican que la pérdida de residuos críticos debida al acortamiento del péptido CAC1 para obtener el péptido P1 domina cualquier posible efecto favorable de las modificaciones efectuadas, en lo referente a la potencia inhibitoria sobre el ensamblaje de la cápsida. Por tanto, esta aproximación racional para la mejora de CAC1 como inhibidor del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 no se continuó.

3.4. Modificación racional del péptido CAC1 para incrementar la solubilidad y actividad inhibitoria del ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1

De forma alternativa y paralela al diseño de péptidos acortados, el grupo del Prof. Neira y el nuestro abordamos conjuntamente una alternativa diferente para la modificación racional de CAC1, encaminada a mejorar su solubilidad y su potencia inhibidora del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1.

Diseño de nuevos péptidos variantes de CAC1. Una característica no deseada del péptido CAC1 es que presenta cierta tendencia a agregar a concentraciones no muy elevadas. Este péptido incluye una región (residuos 176 a 184 de CA) que podría ser propensa a la formación de fibras amiloides, de acuerdo con el análisis comparativo de secuencias realizado por el Dr. Claudio Cavasotto utilizando las bases de datos ZipperDB (Goldschmidt, *et al.*, 2010) y AMYPdb (Pawlicki, *et al.*, 2008). Por tanto, supusimos que una modificación adecuada de esta secuencia podría reducir la tendencia de CAC1 a la agregación. Sin embargo, el péptido resultante debería conservar los residuos críticos para la interacción con CTD. Con estas premisas se diseñó un nuevo péptido derivado de CAC1, denominado CAC1C, en el que Q176, Q179 y E180 se sustituyeron por serina, y N183 por alanina (Fig. 25a).

Basándonos en la secuencia de CAC1C, diseñamos otro péptido variante, denominado CAC1M. En este péptido se introdujeron las siguientes modificaciones racionales adicionales: i) sustitución de S178 por alanina, para mejorar la propensión helicoidal del péptido y porque esta sustitución en CTD condujo a un incremento en la afinidad del proceso de asociación; ii) sustitución de Q192 por alanina, que en CTD fue la causa de un incremento de más de un orden de magnitud en la constante de afinidad de dimerización (del Alamo, *et al.*, 2003) y que también causó un incremento notable en la potencia inhibidora del dominio CTD aislado sobre el ensamblaje de la cápsida (del Alamo y Mateu, 2005); iii) adición de varias serinas en los extremos del péptido, y sustitución de A194 por treonina, para incrementar la solubilidad y para compensar la pérdida de hidrofiliidad causada por algunas de las otras sustituciones realizadas.

Análisis de solubilidad, afinidad por CTD y mapeo del sitio de unión a CTD de los péptidos CAC1C y CAC1M. Estos experimentos fueron realizados por el Prof. Neira utilizando la proteína (no marcada o marcada con ^{15}N) que nosotros habíamos obtenido y purificado. Los péptidos CAC1C y CAC1M presentaron, como CAC1, cierta tendencia a la agregación; sin embargo, sí que resultaron ser apreciablemente más solubles que CAC1. Por ejemplo, en condiciones que implicaban largos tiempos de incubación a una temperatura relativamente elevada, concentraciones de CAC1 mayores de 50 μM condujeron a su precipitación; en cambio, en las mismas condiciones CAC1C y CAC1M permanecieron solubles incluso a concentraciones de 200 μM (resultados no mostrados).

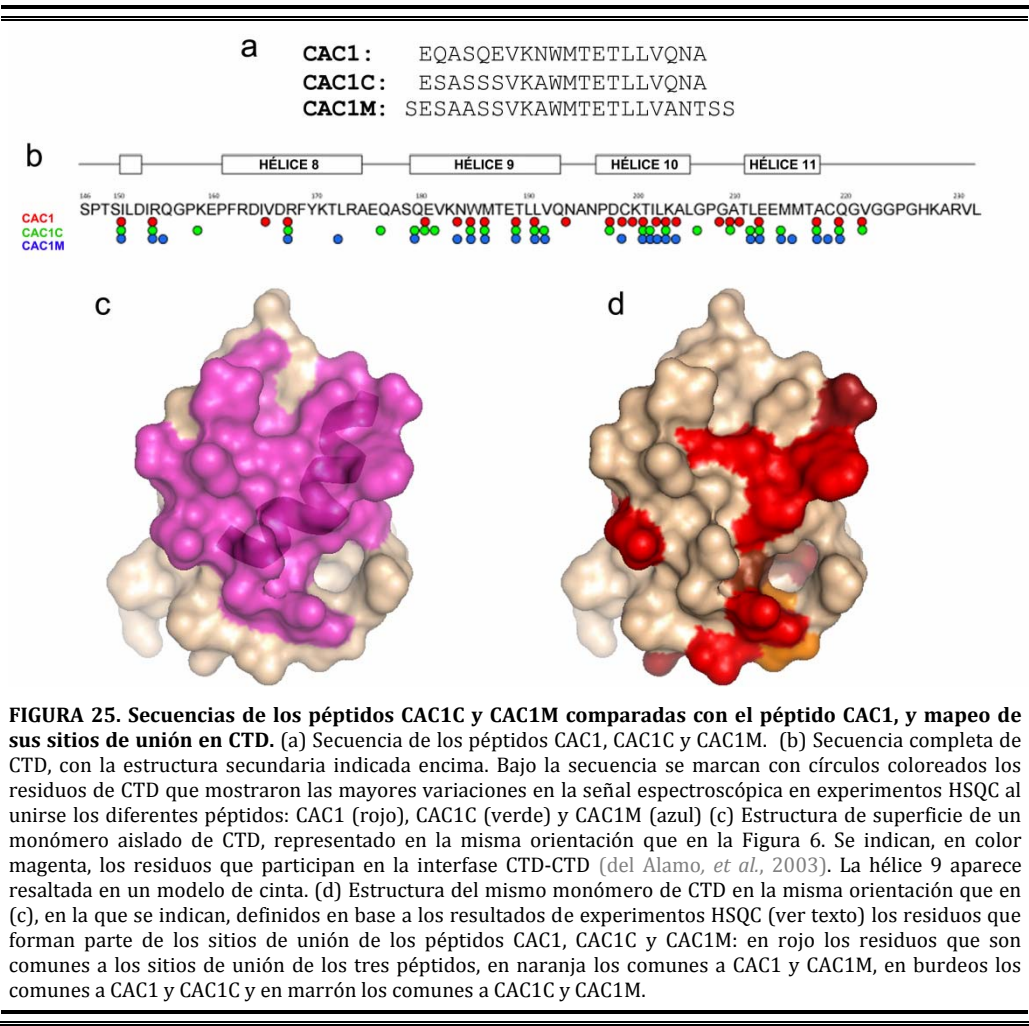
La afinidad de los péptidos CAC1C y CAC1M por CTD fue determinada mediante espectrofluorimetría y se comparó con la de CAC1 obtenida en las mismas condiciones. La

constante aparente de disociación K_{dis} de CAC1C y, especialmente, la de CAC1M, fueron menores que la del péptido parental CAC1 (Tabla 5).

TABLA 5 Constante de equilibrio de disociación ligando-CTD (K_{dis}) para el péptido CAC1 y sus derivados^a.

Péptido	Afinidad por CTD K_{dis} (μ M)
CAC1	50±30
CAC1C	19±8
CAC1M	8±1

^a Todas las medidas se hicieron a 25°C.



A continuación se determinó el sitio de unión de CAC1C y CAC1M a CTD mediante espectroscopía HSQC, como se había hecho para CAC1 (apartado 3.2 de Resultados). Los sitios de unión a CTD de los tres péptidos resultaron ser solapantes en gran medida (Fig. 25b y 25d). Como para CAC1, los sitios de unión de los péptidos derivados CAC1C y CAC1M también solaparon en parte con la interfase de dimerización CTD-CTD (Fig. 25c).

Inhibición del ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1 por los péptidos CAC1C y CAC1M. A continuación ensayamos si las modificaciones introducidas en CAC1 para dar CAC1C o CAC1M permitían obtener un incremento en la actividad inhibitoria del péptido sobre la polimerización de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1. En el ensayo estándar en condiciones de aglomeración molecular, CAC1C fue capaz de inhibir el ensamblaje de la cápsida pero con una eficacia no significativamente superior a la de CAC1 (resultados no mostrados). Por lo tanto, no se continuó el estudio con este péptido. En cambio, CAC1M mostró, en experimentos repetidos e independientes, una actividad inhibitoria del ensamblaje de la cápsida que fue moderadamente superior a la de CAC1. Por ejemplo, a una relación molar péptido:CA de 5 CAC1M causó una inhibición superior a CAC1 en un 20% en lo referente a producción de cápsidas, y en un 30% en lo referente a la velocidad de polimerización (Fig. 26). Los resultados obtenidos en la inhibición de la polimerización de CA en un entorno no aglomerado fueron cualitativamente similares a los descritos (datos no mostrados), y permitieron extraer las mismas conclusiones.

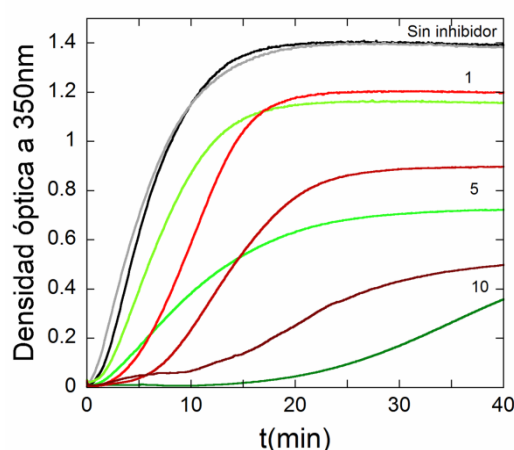


FIGURA 26. Inhibición de la polimerización de CA por el péptido CAC1M. Se siguió la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 mediante la medida de la densidad óptica a 350nm en función del tiempo en ausencia de inhibidores (trazo negro); en presencia de un péptido sin actividad inhibitoria, a una relación molar péptido:CA de 10 (trazo gris); en presencia del péptido CAC1 (trazo rojo); o en presencia del péptido CAC1M (trazo verde). Las relaciones molares CAC1:CA o CAC1M:CA (1, 5 ó 10) se indican junto a cada curva. Las demás condiciones fueron las mismas que en el experimento de la Figura 22. Se muestra un experimento representativo cuyos resultados se han reproducido en experimentos independientes.

En resumen, las modificaciones racionales introducidas en el péptido CAC1 lograron como se pretendía, especialmente en el caso del péptido CAC1M, un incremento en la solubilidad y en la afinidad de asociación con CTD, y un incremento en la capacidad de inhibir, mediante impedimento estérico de la interacción CTD-CTD, el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1.

3.5. Diseño de péptidos que reproducen la secuencia de hélices de CA implicadas en interfases NTD-NTD o NTD-CTD durante el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1

La terapia de combinación anti-VIH-1 ha probado el éxito de una estrategia antiviral basada en mezclas de inhibidores dirigidos contra diferentes dianas. Puesto que en la cápsida madura de VIH-1 existen varios tipos diferentes de interfases discretas, consideramos de interés diseñar otros péptidos que pudieran actuar como inhibidores del ensamblaje al igual que CAC1, pero dirigidos a las interfases NTD-NTD o NTD-CTD. Una combinación de varios de estos inhibidores, que actuarían de modo no competitivo, podría permitir utilizar menores concentraciones de cada uno de los inhibidores para obtener la misma actividad inhibidora del ensamblaje.

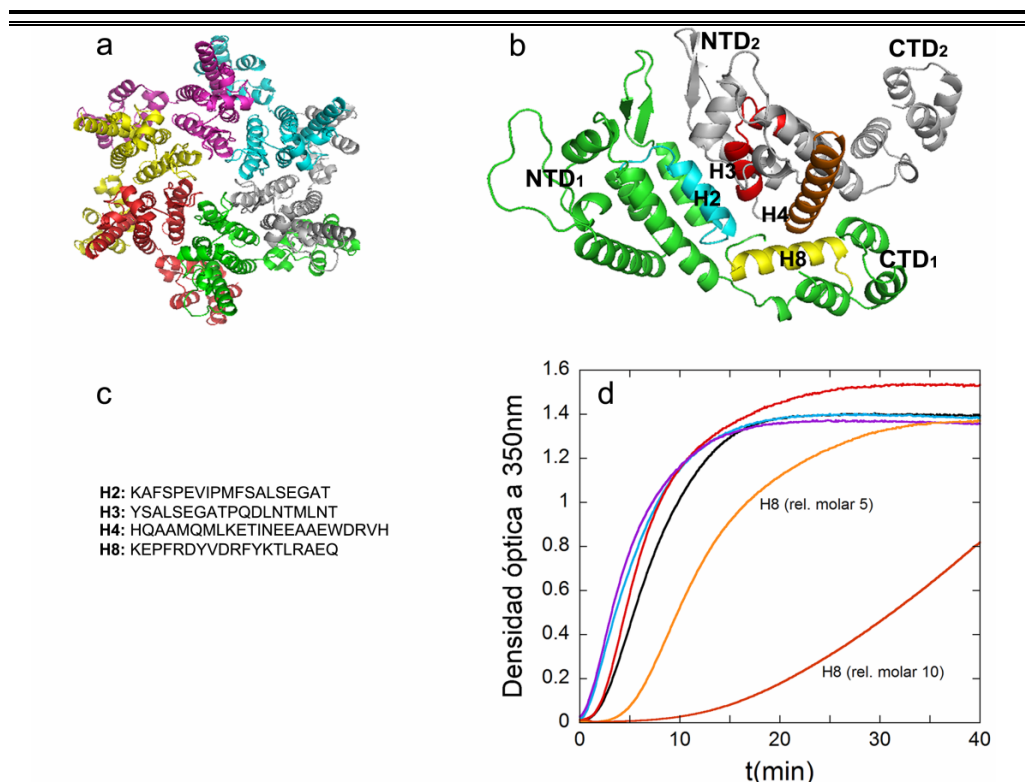


FIGURA 27. Inhibición de la polimerización de CA por los péptidos H2, H3, H4 y H8. (a) Modelo cristalográfico del hexámero de CA (Pornillos, *et al.*, 2009). Cada monómero está representado en un color distinto. (b) Detalle de las interfases CTD-NTD y NTD-NTD entre dos monómeros del hexámero de CA. La orientación de los monómeros de CA se ha modificado respecto a la representada en (a), para mayor claridad. Se resaltan las hélices que se han sintetizado como péptidos independientes: H2 (en azul), H3 (en rojo), H4 (en marrón) y H8 (en amarillo). (c) Secuencias correspondientes a los cuatro péptidos sintetizados. (d) Se siguió la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 mediante la medida de la densidad óptica a 350nm en función del tiempo, en ausencia de inhibidores (trazo negro); en presencia de H2 (trazo azul; relación molar H2:CA 10), H3 (trazo rojo, relación molar 10), H4 (trazo violeta, relación molar 10) y H8 (trazos en dos tonos de naranja, relaciones molares 5 y 10, indicadas en la figura). Las demás condiciones fueron las mismas que en el experimento de la Figura 22. Se muestra un experimento representativo cuyos resultados se han reproducido en experimentos independientes.

Para la realización de este objetivo seguimos una aproximación similar a la utilizada para el diseño de CAC1. La evidencia disponible revela que las hélices 2 y 3 en el NTD están implicadas en la hexamerización de CA a través de las interfases NTD-NTD, y las hélices 4 en NTD y 8 en CTD están implicadas en la heterodimerización NTD-CTD entre subunidades vecinas en el hexámero (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2007; Pornillos, *et al.*, 2009). Por lo tanto, diseñamos cuatro péptidos sintéticos que reproducen las secuencias de estos segmentos helicoidales de CA, que denominamos H2, H3, H4 y H8, respectivamente (Fig. 27a, 27b y 27c).

La actividad inhibitoria de estos péptidos sobre la oligomerización de CA en partículas semejantes a cápsidas se evaluó como para los péptidos anteriores en un ensayo estándar en condiciones de aglomeración molecular (Fig. 27d). Los péptidos H2, H3 y H4 no fueron capaces de inhibir el ensamblaje de la cápsida ni a las concentraciones más elevadas de péptido probadas. Por el contrario, el péptido H8 fue capaz de inhibir el ensamblaje de la cápsida de forma sustancial y reproducible en ensayos independientes, aunque su actividad inhibitoria resultó menor que la de CAC1 o CAC1M.

3.6. Inhibición del ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1 por mezclas de péptidos

La aproximación que iniciamos para el diseño racional de péptidos inhibidores del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 dio como resultado los péptidos CAC1 y su derivado CAC1M y H8, que están basados en hélices de CTD implicadas en interfases de oligomerización diferentes.

Además de estos péptidos, un abordaje puramente combinatorial (Sticht, *et al.*, 2005) había llevado a identificar el péptido CAI que también inhibe el ensamblaje de la cápsida madura pero se une a una región diferente de CA (Ternois, *et al.*, 2005). Por tanto, por primera vez se disponía de varios inhibidores interfásicos cuyos efectos podían combinarse utilizando una mezcla de los mismos.

Se utilizaron mezclas con dosis sub-inhedoras de los péptidos CAC1M, H8 y/o CAI en ensayos estándar de inhibición *in vitro* del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 en un entorno aglomerado (Fig. 28).

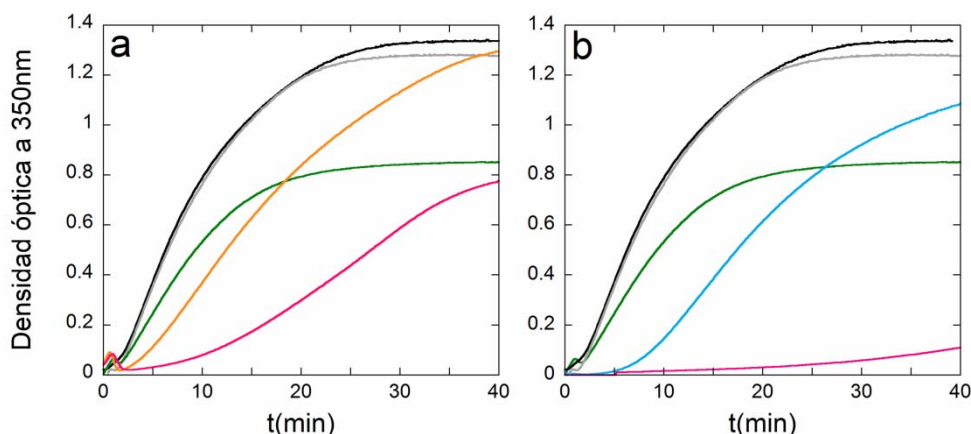


FIGURA 28. Inhibición de la polimerización de CA por mezclas del péptido CAC1M con los péptidos H8 o CAI. Se siguió la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 mediante la medida de la densidad óptica a 350nm en función del tiempo. (a) Polimerización de CA en ausencia de inhibidores (trazo negro) o en presencia de un péptido sin actividad inhibitoria (trazo gris, relación molar péptido:CA 10); CAC1M (trazo verde, relación molar péptido:CA 2); H8 (trazo naranja, relación molar péptido:CA 5); o de una mezcla CAC1M + H8 (trazo rosa, mismas relaciones molares que las utilizadas para la inhibición por estos péptidos separadamente). (b) Polimerización de CA en ausencia de inhibidores (trazo negro), o en presencia de un péptido sin actividad inhibitoria (trazo gris, relación molar péptido:CA 10); CAC1M (trazo verde, relación molar péptido:CA 2); CAI (trazo azul, relación molar péptido:CA 0.2); o de una mezcla de CAC1M y CAI (trazo rosa, mismas relaciones molares que las utilizadas para la inhibición por estos péptidos separadamente). Las demás condiciones fueron las mismas que en el experimento de la Figura 22. En cada panel se muestra un experimento representativo cuyos resultados se han reproducido en experimentos independientes.

Los péptidos individuales, en las bajas concentraciones elegidas para el nuevo conjunto de ensayos, causaron únicamente una reducción menor del ensamblaje de la cápsida como se esperaba. La mezcla de los péptidos CAI y H8 no resultó mejor inhibidor que cualquiera de los péptidos por separado (resultados no mostrados). Por el contrario, la mezcla de CAC1M con H8 produjo un efecto inhibitorio aditivo (Fig. 28a).

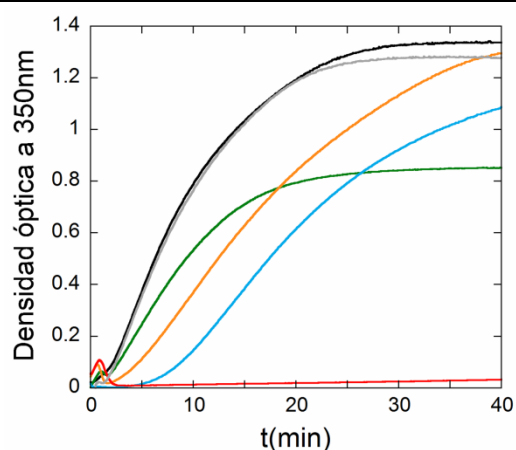
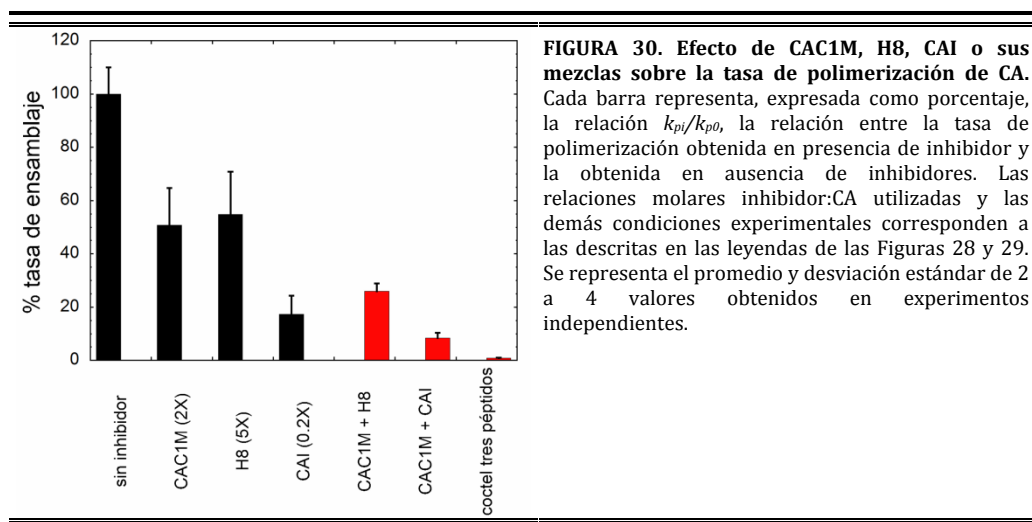


FIGURA 29. Inhibición de la polimerización de CA por una mezcla de los péptidos CAC1M, H8 y CAI. Se siguió la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 mediante la medida de la densidad óptica a 350nm en función del tiempo, en ausencia de inhibidores (negro), o en presencia de un péptido sin actividad inhibitoria (trazo gris, relación molar péptido:CA 10); CAC1M (trazo verde, relación molar péptido:CA 2); CAI (trazo azul, relación molar péptido:CA 0.2); H8 (trazo naranja, relación molar péptido:CA 5); o de una mezcla de CAC1M, CAI y H8 (trazo rojo, mismas relaciones molares que las utilizadas para la inhibición por estos péptidos separadamente). Las demás condiciones fueron las mismas que en el experimento de la Figura 22. Se muestra un experimento representativo cuyos resultados se han reproducido en experimentos independientes.

De modo notable, la mezcla de CAC1M con CAI (Fig. 28b) o de los tres péptidos (Fig. 29) condujo a la inhibición completa del ensamblaje de la cápsida a bajas concentraciones individuales de cada péptido que presentaban un escaso efecto inhibidor. En la Fig. 30 se muestran las medias de las tasas de polimerización alcanzadas en estos experimentos con las dosis de péptidos utilizadas



En resumen, los péptidos CAI, CAC1, CAC1M y H8 son capaces de inhibir completamente (o mayoritariamente en el caso de H8) el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1 si se utilizan dosis relativamente elevadas. La utilización de mezclas de los péptidos CAI y CAC1M, CAC1M y H8, o CAI, CAC1M y H8 permite reducir en gran medida la dosis necesaria para conseguir una inhibición completa o casi completa. Los resultados revelan además que en la actividad inhibitoria sobre el ensamblaje de la cápsida existe una exclusión funcional entre los péptidos CAI y H8, un efecto aditivo entre CAC1M y H8, y un efecto posiblemente sinérgico entre CAC1M y CAI.

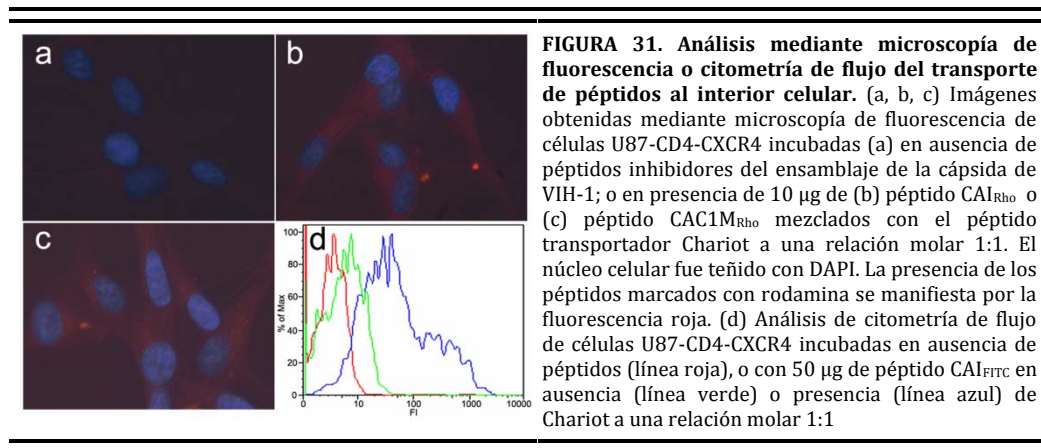
3.7. Inhibición por péptidos de la infectividad de VIH-1 en células en cultivo

El presente estudio *in vitro* ha permitido demostrar que los péptidos diseñados son capaces de inhibir la polimerización de CA de VIH-1 en partículas con la organización estructural de cápsidas maduras. Un estudio detallado *ex vivo* del efecto de estos péptidos sobre diferentes etapas del ciclo viral y especialmente del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 en células deberá realizarse más adelante. No obstante, quisimos comprobar, como último paso de este estudio, y paso preliminar de futuros estudios *ex vivo*, si estos péptidos eran capaces de inhibir el proceso de infección por VIH-1 en células en cultivo.

Transporte de los péptidos al interior celular. Ninguno de los péptidos CAC1, CAC1M, H8 o CAI son capaces de ser transportados por sí mismos al interior celular. Por ello, su transporte se realizó utilizando el péptido transportador comercial *Chariot* tal y como se describe en el apartado 13 de Materiales y Métodos.

Inicialmente se utilizaron células NB324K. Como control positivo de transporte se utilizó la proteína β -galactosidasa, y como péptido de prueba se utilizó CAI marcado con FITC (CAI_{FITC}). El transporte eficaz de este péptido a estas células se comprobó mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia (resultados no mostrados).

Las condiciones así establecidas para el transporte de péptidos se utilizaron entonces sobre células U87-CD4-CXCR4, susceptibles a la infección por VIH-1. Debido a la elevada autofluorescencia de estas células en el canal de emisión verde, se utilizaron péptidos marcados con rodamina. Para confirmar que el transporte ocurría independientemente de la secuencia del péptido, se utilizaron varios péptidos de prueba CAC1M_{Rho}, CAI_{Rho}, y H2_{Rho}. Los resultados de microscopía de fluorescencia (Fig. 31a, 31b y 31c, y datos no mostrados) suministraron evidencia de que estos péptidos eran efectivamente transportados. Se obtuvo evidencia adicional del transporte de péptidos utilizando CAI_{FITC} en ensayos de citometría de flujo (Fig. 31d).



Finalmente, para descartar la posibilidad de que los péptidos estuvieran simplemente adheridos a la membrana celular, se tomaron imágenes mediante microscopía confocal de células tratada con CAI_{FITC} y el péptido transportador (Fig. 32). La fluorescencia asociada al péptido se aprecia en los planos localizados en el interior de la célula, pero no en los planos localizados en su superficie.

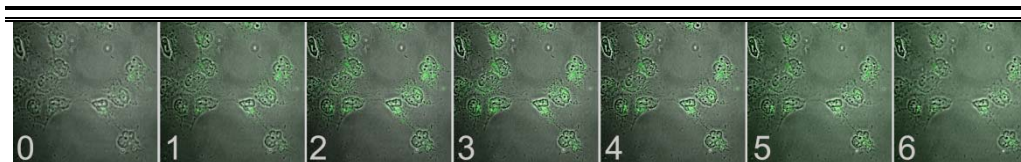


FIGURA 32. Análisis mediante microscopía confocal del transporte del péptido CAI_{FITC} al interior celular. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células NB324K incubadas con 10 µg del péptido CAI_{FITC} mezclado con Chariot, a una relación molar 1:1. Se muestran las imágenes superpuestas de emisión de fluorescencia y contraste de fases en los distintos planos enfocados en un mismo campo, siendo 0 el plano más inferior y 6 el superior

Inhibición de la infectividad de VIH-1 por péptidos interfásicos. Una vez puesto a punto el método de transporte de péptidos al interior de células susceptibles de infección por VIH-1, se comprobó que ninguno de los péptidos resultaba tóxico para las células a las concentraciones utilizadas en este estudio, y se determinó su capacidad para inhibir la infección de células U87-CD4-CXCR4 por VIH-1 como se ha descrito en el apartado 14 de Materiales y Métodos.

Para los experimentos de inhibición de infectividad se utilizaron los péptidos diseñados por nosotros CAC1, CAC1M, y H8. Incluimos también CAI porque, aunque su péptido derivado NYAD-1 tiene la capacidad intrínseca de penetrar células e inhibir la infección de VIH-1 (Zhang, *et al.*, 2008), CAI no había sido ensayado como inhibidor de infectividad. Además, su inclusión permitiría que ensayáramos *ex vivo* las mismas mezclas de péptidos que habían resultado tan eficaces para inhibir el ensamblaje *in vitro* de la cápsida.

Las células se incubaron con una mezcla de uno o más péptidos inhibidores y el péptido Chariot, y posteriormente fueron infectadas con VIH-1 (cepa HXB2) a una multiplicidad de infección de 0,0015. La cantidad de virus progenie producida a las 72h postinfección se determinó mediante titulación de la cantidad de CA (antígeno p24) producida (Fig. 33). En ausencia de péptidos añadidos, las células producen una considerable cantidad de virus. Como esperábamos, el péptido H4, utilizado como control negativo ya que no es capaz de inhibir la polimerización *in vitro* de CA, no produjo ninguna inhibición de la infección *ex vivo* por VIH-1, ni siquiera a concentraciones elevadas (de hasta 2 mM) (Fig. 33).

Los péptidos CAC1, CAC1M, H8 y CAI de forma aislada, mostraron en las condiciones del ensayo una capacidad inhibitoria muy reducida de la producción de VIH-1. En el caso de CAC1 y CAC1M esta pequeña capacidad inhibitoria no pudo ser estadísticamente conformada en las condiciones del experimento, mientras que H8 y produjeron una inhibición que sí fue significativa, aunque sólo a elevadas concentraciones (hasta 2 mM) (Fig. 33). No obstante, las mezclas de péptidos CAC1 ó CAC1M + H8; CAC1 ó CAC1M + CAI; y CAC1 ó CAC1M + H8 + CAI a dosis menores sí que fueron capaces de inhibir sustancialmente (sobre el 90%) la producción de VIH-1 (Fig.

33). Estos resultados son razonablemente consistentes con la mayor capacidad inhibitoria sobre el ensamblaje *in vitro* de las mezclas de péptidos, comparada con las de los péptidos por separado a dosis en general proporcionales a las utilizadas en estos experimentos.

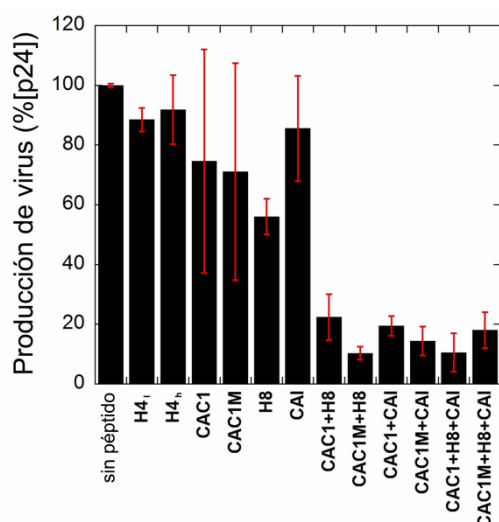


FIGURA 33. Análisis de la actividad inhibitoria de diversos péptidos sobre la infección de células en cultivo por VIH-1. Los péptidos H4 (a 0,8 mM, indicado H4_i en la figura, o a 1,7 mM, indicado H4_h), CAC1, CAC1M o CAI (a 170 µM) y H8 (a 2,6 mM), y las mezclas de péptido que se indican en la figura, se incubaron con Chariot y se transportaron al interior de células U87-CD4-CXCR4, que fueron posteriormente infectadas con la cepa HXB2 de VIH-1 (0,0015 TCID₅₀/ célula) como se describe en Materiales y Métodos. A las 72 h postinfección se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la cantidad de CA producida (antígeno p24). Los valores obtenidos fueron normalizados a la cantidad obtenida de p24 cuando no se añade ningún péptido inhibidor. Una producción de virus del 100% corresponde a 37000 pg/ml de antígeno p24. En la figura se muestra la media y el error estándar de datos obtenidos en varios experimentos independientes.

En resumen, los péptidos interfásicos CAC1, CAC1M y H8 diseñados racionalmente fueron capaces de inhibir eficazmente el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 *in vitro*, y mezclas entre estos péptidos, o de ellos con el péptido CAI, fueron capaces de inhibir eficazmente tanto el ensamblaje de la cápsida madura *in vitro* como la infección por VIH-1 *ex vivo*.

4. Evaluación de aproximaciones combinatoriales al reconocimiento molecular en las interfases CTD-CTD de la cápsida madura de VIH-1

La aproximación enteramente racional descrita en el apartado anterior para el diseño y/o modificación de péptidos capaces de inhibir el ensamblaje de la cápsida madura y la infectividad del virión de VIH-1 permitió obtener varios péptidos activos, en particular CAC1, su derivado CAC1M y H8. Con anterioridad a estos resultados, se habían identificado otros inhibidores peptídicos de estos procesos, CAI mediante la utilización de una aproximación combinatorial enteramente al azar (Sticht, *et al.*, 2005), y NYAD-1 como un variante de CAI (Zhang, *et al.*, 2008). Aunque todos estos péptidos son inhibidores

eficaces del ensamblaje de la cápsida *in vitro*, sería deseable como parte del proceso de desarrollo de inhibidores interfásicos la obtención de variantes más activos, que permitieran reducir la dosis todo lo posible.

Por ello, como cuarto objetivo de este estudio nos planteamos la exploración de aproximaciones combinatoriales semi-racionales para tratar de obtener variantes derivados de los péptidos CAC1 y/o CAI, o bien del dominio CTD completo, que presentaran mayor afinidad por CA, y por tanto fueran potencialmente más activos en la inhibición de ensamblaje de la cápsida de VIH-1. Para estos estudios se contó con la estrecha e importante colaboración técnica de la Lda. Alicia Rodríguez de nuestro laboratorio.

4.1. Intentos de selección mediante presentación en fagos de péptidos combinatoriales derivados de CAC1 o CAI con mayor afinidad por CA

Diseño semi-racional de variantes combinatoriales de CAC1 y CAI. En el caso de CAC1, se decidió combinatorializar sólo algunas de las posiciones para las que el correspondiente residuo no resultaba crítico para la interacción CTD-CTD (y presumiblemente tampoco para la interacción CTD-CAC1).

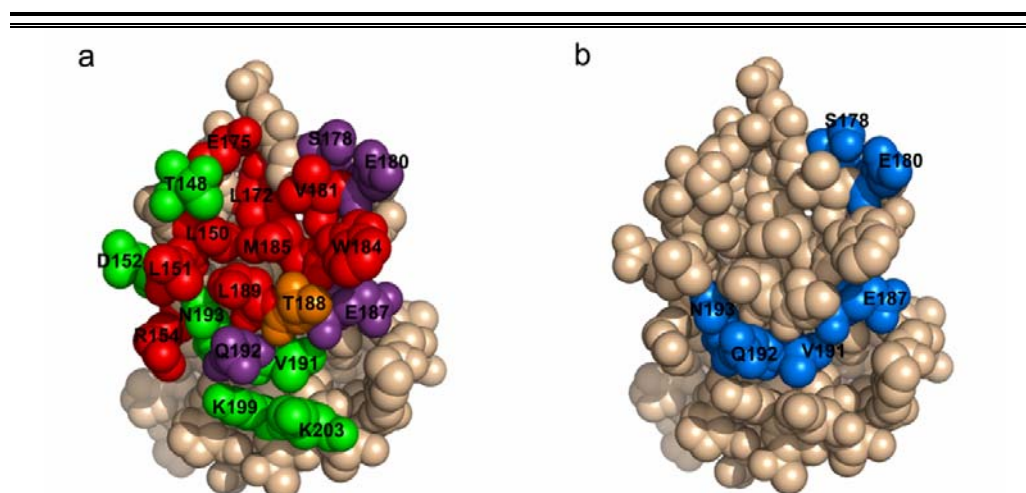


FIGURA 34. Localización en la interfase CTD-CTD de residuos elegidos para su combinatorialización. (a) Modelo de Van der Waals de un monómero de CTD, orientado de forma que la interfase de dimerización queda frente al observador. Los residuos interfásicos están numerados y se representan mediante un código de colores, según el efecto de su mutación a alanina sobre el proceso de asociación. Rojo, la eliminación de la cadena lateral hace la proteína monomérica incluso a altas concentraciones; naranja, la eliminación de la cadena lateral supone una reducción importante de la afinidad; verde, la eliminación de la cadena lateral no afecta significativamente a la asociación, o reduce ligeramente la afinidad; violeta, la eliminación de la cadena lateral produce un incremento en la afinidad (del Alamo, *et al.*, 2003). (b) el mismo modelo del monómero de CTD, en el que se muestran en azul los residuos de la interfase que se seleccionaron para combinatorializar.

En concreto, se eligieron para su mutación combinatorial 6 residuos (S178, E180, E187, V191, Q192 y N193) cuya mutación a alanina no afectaba a la afinidad de dimerización, o incluso daba lugar a un aumento de dicha afinidad (del Alamo, *et al.*, 2003) (Fig. 34).

En el caso del péptido CAI, decidimos mutagenizar aquellas posiciones que interaccionan directamente con CTD. En el complejo CTD-CAI, el péptido interacciona con CTD encajándose en un surco hidrofóbico formado por las hélices 8, 9 y 10, con lo que el complejo CTD-CAI adopta la forma de un haz de cinco hélices α (Ternois, *et al.*, 2005) (Fig. 35a). Se eligieron por tanto para su combinatorialización 5 residuos que participaban sobre todo en interacciones hidrofóbicas con CTD, limitando las combinaciones para favorecer la mutación a otros residuos hidrofóbicos (y no a residuos polares), como se describe en el apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos. Esta aproximación mantendría el carácter hidrofóbico de la región de CAI que debe interaccionar con CTD (Fig. 35b).

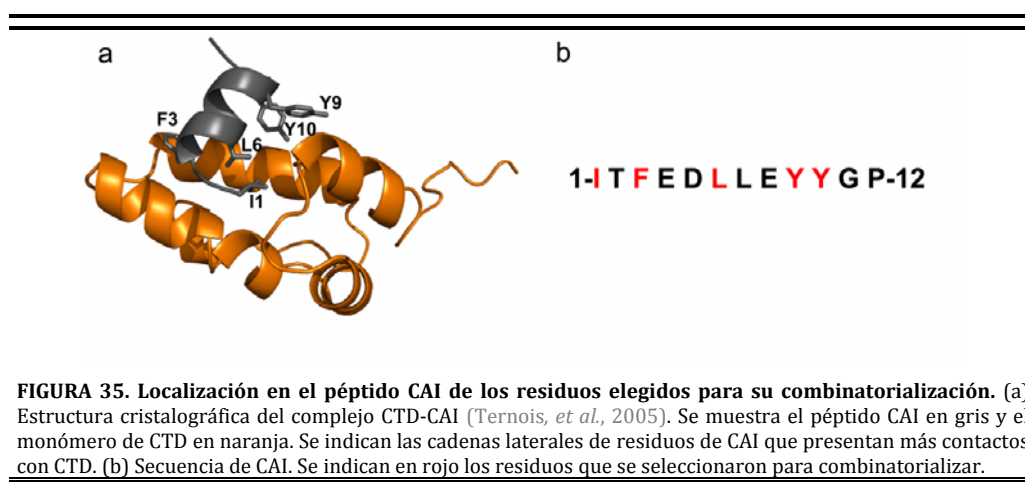


FIGURA 35. Localización en el péptido CAI de los residuos elegidos para su combinatorialización. (a) Estructura cristalográfica del complejo CTD-CAI (Ternois, *et al.*, 2005). Se muestra el péptido CAI en gris y el monómero de CTD en naranja. Se indican las cadenas laterales de residuos de CAI que presentan más contactos con CTD. (b) Secuencia de CAI. Se indican en rojo los residuos que se seleccionaron para combinatorializar.

Aproximación experimental para la presentación en fagos y selección de péptidos variantes. La secuencia de nucleótidos correspondiente a la hélice 9 de CA (péptido CAC1) o al péptido CAI se introdujo en el vector apropiado utilizando sistema comercial *PhD Peptide Display Cloning System* (New England Biolabs) como se describe en el apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos. La secuenciación de los recombinantes demostró que las secuencias correspondientes a CAC1 o a CAI habían sido correctamente introducidas.

Como sistema de selección de péptidos expresados en la superficie del fago en función de su afinidad por CA de VIH-1, se utilizó el mismo sistema de bolitas magnéticas empleado por Sticht (Sticht, *et al.*, 2005) para la selección original de CAI a partir de una biblioteca de secuencias al azar. CA purificada se unió covalentemente a las bolitas magnéticas como se ha descrito en el apartado 5.1.3 de Materiales y Métodos. En el lavado de las bolitas apenas se detectó CA, lo que indicaba que CA había sido

efectivamente inmovilizada en la superficie de las bolitas. Para comprobar que estas bolitas activadas son realmente capaces de unir específicamente CAC1 o CAI unidos a fagos, se obtuvieron y purificaron fagos que expresan CAC1 o CAI no mutados, como se detalla en el apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos. Se realizaron dos rondas de unión de los fagos a las bolitas, lavado para eliminar uniones inespecíficas, elución de los fagos retenidos y amplificación de los fagos eluidos, con la diferencia de que en la primera ronda el lavado se hizo con TS, 0,1% Tween-20 y en la segunda con TS, 0,5% Tween-20 (para tratar de reducir interacciones inespecíficas), como se especifica en el apartado 5.1.3 de Materiales y Métodos. Como control negativo se utilizaron fagos que no expresan ninguno de los péptidos. Para cada ronda de unión entre fagos y bolitas se titularon los fagos utilizados para el proceso, y los que se eluyeron, y se calculó el porcentaje de fagos que habían sido retenidos. Típicamente, en los varios casos en que se realizó este procedimiento para los péptidos CAC1 o CAI, la cantidad de fagos presentadores de péptido retenidos al final del proceso fue, respectivamente, entre uno y dos órdenes de magnitud, o entre dos y tres órdenes de magnitud mayor que la de fagos control que no expresaban ningún péptido. Por tanto, el sistema permitía en principio realizar la selección de fagos presentadores en función de la afinidad del péptido presentado por la CA inmovilizada en las bolitas.

A continuación se procedió a realizar la combinatorialización de los péptidos CAC1 o CAI expresados por los fagos, como se detalla en el apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos, utilizando los criterios semi-rationales explicados para la elección de un número limitado de posiciones a combinatorializar. Tanto en el caso de CAC1 como en el de CAI se obtuvieron bibliotecas de variantes de estos péptidos expresados en la superficie de los fagos. Sin embargo, la eficiencia del proceso fue muy escasa y las poblaciones combinatoriales de fagos obtenidas en ambos casos muy limitada.

Para comprobar si se habían efectivamente producido algunos variantes, se clonaron biológicamente mediante plaqueo los fagos de las bibliotecas y se determinó la secuencia correspondiente de algunos clones. Solo dos de los cuatro clones evaluados de una biblioteca derivada de CAC1, y dos de los 12 clones evaluados de una biblioteca derivada de CAI presentaron la secuencia correspondiente al péptido integrada en su genoma; estos cuatro clones sí presentaban sustituciones en la secuencia correspondiente al péptido expresado, con respecto a los péptidos parentales CAC1 o CAI. El resto de los clones secuenciados correspondían a fagos M13 parentales en los que no se había introducido ninguna secuencia heteróloga. Debido a ambos factores, la limitada eficiencia del subclonaje, y la contaminación que arrastramos de fagos M13 parentales, el número de variantes presentes en la librería no superaría en ningún caso un valor de aproximadamente 10^4 .

A pesar de la muy baja calidad de las bibliotecas de fagos que presentan CAC1 o CAI, se realizaron algunos intentos de selección de péptidos variantes que pudieran presentar una mayor afinidad por CA, mediante el procedimiento de *panning* en bolitas magnéticas utilizando tres rondas de unión, lavado, elución y amplificación de fagos unidos. Tras el proceso se clonaron biológicamente algunos fagos de las poblaciones

finales obtenidas, y se secuenciaron entre 10 y 15 de los clones. En todos los casos, los fagos secuenciados carecían de la secuencia correspondiente al péptido CAC1 o CAI.

En resumen, durante los intentos de combinatorialización de péptidos CAC1 y CAI presentados en fagos y de selección de fagos con péptidos variantes de mayor afinidad por CA, se presentaron diversos problemas técnicos que, a pesar de repetidos intentos, no hemos podido resolver, y cuyas causas no están claras. El abordaje combinatorial

4.2. Combinatorialización del dominio CTD y selección o cribado de variantes

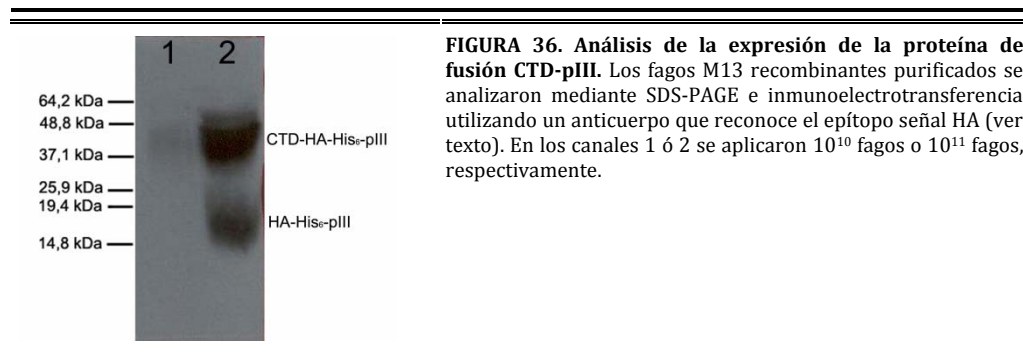
De modo paralelo a la combinatorialización de péptidos CAC1 y CAI, consideramos un segundo abordaje de combinatorialización semi-racional basado en el dominio CTD completo, para tratar de incrementar su actividad inhibitoria sobre el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1. Las razones originales para intentar este abordaje fueron diversas: i) CTD es activo como inhibidor del ensamblaje de la cápsida en ensayos *in vitro*; debido a la posibilidad de introducir proteínas enteras en células (mediante el uso de péptidos transportadores), CTD también podría usarse como inhibidor experimental de la infección de VIH-1 *ex vivo*; ii) Las sustituciones de aminoácidos que aumentarían la afinidad de dimerización de CTD identificadas mediante este abordaje podrían introducirse directamente en el péptido CAC1 o derivados, para tratar de incrementar la actividad inhibitoria de estos péptidos sobre el ensamblaje y la infectividad; iii) Esta aproximación combinatorial sobre CTD permitiría además profundizar en otro aspecto del ensamblaje de cápsidas víricas en el que nuestro grupo ha venido trabajando: la identificación en interfases de cápsidas víricas de diferentes soluciones estructurales, en particular conjuntos de sustituciones compensatorias, que permitan mantener su funcionalidad (es decir, su capacidad de autoasociación) (Mateo, *et al.*, 2007; Luna, *et al.*, 2009). De hecho, en uno de nuestros estudio previos ya habíamos detectado la posibilidad de que en la interfase CTD-CTD hayan ocurrido durante la evolución de VIH-1 y otros retrovirus relaciones mutaciones compensatorias que preservan selectivamente una baja afinidad de dimerización (del Álamo y Mateu, 2005).

Las posiciones elegidas para la combinatorialización semi-racional de CTD fueron las mismas 6 posiciones combinatorializadas en el péptido CAC1, y se eligieron por las mismas razones (ver apartado 4.1 de Resultados).

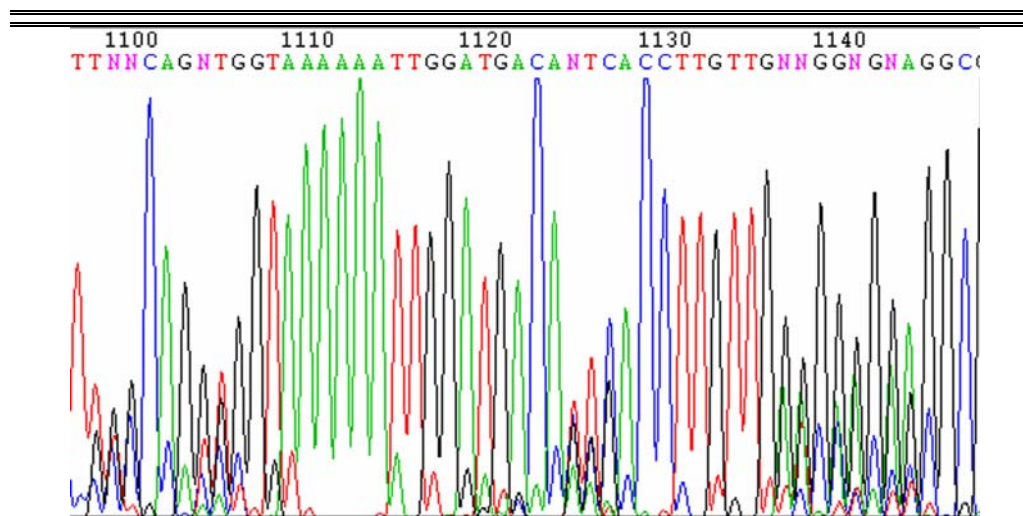
Intentos de combinatorialización de CTD mediante presentación en fagos.

Para poder obtener variantes de CTD mediante esta aproximación, el fagémido pComb3XCAC fue obtenido en nuestro laboratorio por la Dra. Marta del Álamo mediante clonaje de CTD en el fagémido pComb3X, como se indica en el apartado 1 de Materiales y Métodos. Mediante secuenciación se comprobó que CTD había sido clonada correctamente. A partir del fagémido se obtuvieron, del modo descrito en el apartado 5.1.1 de Materiales y Métodos, fagos que presentan en promedio una sola copia del dominio CTD fusionado a una subunidad de la proteína minoritaria pIII de la cápsida. Se

comprobó mediante inmunoelectrotransferencia que la proteína CTD se expresa fusionada a pIII del fago (Fig. 36). Se observaron dos bandas de tamaño compatible, respectivamente, con las fusiones CTD-His₆-HA-pIII (de aproximadamente 30 kDa) e His₆-HA-pIII/HA-pIII (de aproximadamente 20 kDa). La presencia de esta última banda sugiere que parte de CTD podría estar siendo procesada proteolíticamente.



El siguiente paso fue llevar a cabo la combinatorialización de CTD del modo que se describe en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos. Se obtuvo así la biblioteca combinatorial fago-CTD_{combi}. La secuenciación de la región combinatorializada en el gen de CTD en la población heterogénea de fagos obtenida reveló secuencias ambiguas en las 6 posiciones combinatorializadas (Fig. 37), lo que indicaba que la combinatorialización había sido correcta.



A partir de esta población se aislaron y secuenciaron diez clones moleculares. Solamente uno carecía de mutaciones, aunque en 4 de los 10 clones se observaron inserciones o deleciones de nucleótidos no combinatorializados (Tabla 6). Este tipo de mutaciones que producen cambios en el marco de lectura darán lugar a proteínas truncadas prematuramente o con plegamiento anómalo. Aunque aproximadamente un 40% de los fagos en la muestra llevarán adosada una molécula de CTD truncada o de secuencia errónea, estas variantes no afectan al resultado, ya que no tienen por qué interferir con la selección de las CTD variantes más afines por CA.

TABLA 6. Residuos aminoacídicos encontrados en posiciones combinatorializadas en CTD expresadas por algunos clones moleculares de una biblioteca de pComb3XCAC.

Clon molecular	178	180	187	191	192	193	Mut. acompañantes
wt	S	E	E	V	Q	N	no
1	S	E	E	V	Q	N	no
2	G	G	P	P	P	P	no
3	V	L	F	G	G	G	delección
4	P	P	P	D	G	G	no
5	V	S	V	V	A	V	no
6	H	T	A	K	K	K	no
7	S	F	R	G	G	G	inserción
8	-	-	-	-	-	-	sec. ambigua
9	L	F	F	G	R	G	delección
10	L	L	L	F	H	P	no

Para la selección de los variantes combinatoriales de CTD, se trataron de poner a punto varias técnicas diferentes de selección (*panning*) de aquellos fagos que presentaran CTD variantes con mayor afinidad por CA: i) unión a bolitas magnéticas que presentan CA covalentemente unida (como se ha descrito para el caso de la selección de péptidos); ii) unión a placas de ELISA que presentan CA covalentemente unida; iii) unión a una columna que contiene una matriz que presenta CA covalentemente unida (apartado 5.1.3 de Materiales y Métodos). Todos estos métodos se ensayaron con fagos que expresaban en su superficie CTD_{wt} (fago-CTD_{wt}), utilizando como control negativo fagos que no expresaban ninguna proteína heteróloga en su superficie. A pesar de intentos repetidos y variando de diversas maneras las condiciones experimentales de asociación, lavado y elución, no se observaron diferencias en el título de fagos recuperados con ambos tipos de fagos. A pesar de este problema se decidió intentar la selección de variantes combinatoriales de CTD con mayor afinidad por CA a partir de una biblioteca fago-CTD_{combi}, tanto por el método de *panning* en placas de ELISA como por el método de

panning en bolitas magnéticas. De nuevo, en ningún caso se obtuvieron diferencias en el título de fagos entre la muestra y el control.

En resumen, como en el caso de los péptidos, el abordaje combinatorial sobre CTD mediante presentación en fagos no ha funcionado, al menos por el momento. En este caso, los resultados de unión, selección y de electroforesis de las proteínas del fago (ver más arriba) indican que es probable que CTD fusionado a pIII no pueda plegarse correctamente, a pesar del espaciador utilizado, de modo que es no funcional, o incluso resulta degradado.

Combinatorialización de CTD y selección mediante cribado de colonias (colony screening). Como un abordaje alternativo a la presentación de CTD en fagos consideramos un método de cribado de colonias bacterianas que expresen diferentes variantes combinatoriales de CTD.

Este método ha sido diseñado y puesto a punto originalmente por nosotros (apartado 5.2 de Materiales y Métodos). El gen de CTD clonado en un vector de expresión se combinatorializó del modo referido en el apartado anterior, y la biblioteca de plásmidos recombinantes se utilizó para transformar bacterias. La población de bacterias se plaqueó, y una fracción de cada colonia se transfirió a una membrana de nitrocelulosa utilizando la técnica de réplica en placa. Las bacterias transferidas se lisaron *in situ* y la membrana se incubó con una solución de CA no mutada fusionada a un epítipo FLAG (CA_{FLAG}). Por último las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-FLAG y se revelaron mediante un ensayo de luminiscencia. Asumiendo que la expresión de CTD es similar en todas las colonias, es razonable asumir que aquellas colonias que den lugar a una señal más intensa serán las que estén expresando una variante de CTD correctamente plegada y con mayor afinidad por CA. Naturalmente, esta suposición se confirmaría después mediante experimentos bioquímicos con las variantes de CTD así identificadas, para descartar falsos positivos.

En primer lugar se realizaron ensayos control para comprobar la capacidad del método para identificar variantes de CTD de mayor afinidad. Para ello, se utilizaron mezclas aproximadamente al 50% de dos tipos de bacterias, unas que expresan CTD_{wt} y otras que expresan un mutante, CTD-Q192A (que tiene una afinidad de dimerización unas 20 veces mayor que CTD_{wt} (del Alamo, *et al.*, 2003)).

Se seleccionaron en varios ensayos 17 colonias que presentaban una señal más intensa, especialmente con respecto a las de su alrededor (asumiendo que serían CTD-Q192A), y otras 17 colonias que presentaban una señal más débil, especialmente con respecto a las de su alrededor (asumiendo que serían CTD_{wt}). Un ensayo típico se muestra en la Fig. 38. La secuenciación de la región de CTD en los correspondientes plásmidos recombinantes obtenidos a partir de estas colonias reveló que de las 17 colonias que se asumieron como CTD_{wt}, 12 lo fueron, 3 resultaron ser el mutante CTD-Q192A y otras dos resultaron dar secuencias ambiguas; mientras que de las 17 que se suponían CTD-Q192A, 15 fueron efectivamente CTD-Q192 y dos fueron secuencias ambiguas. El porcentaje de acierto fue, por tanto, de aproximadamente un 70% para CTD_{wt} y de un 90% para CTD-

Q192A. Por tanto, el método funciona y es lo bastante sensible como para poder discriminar, con un bajo número de falsos positivos, entre variantes de CTD que se diferencian únicamente en poco más de un orden de magnitud.

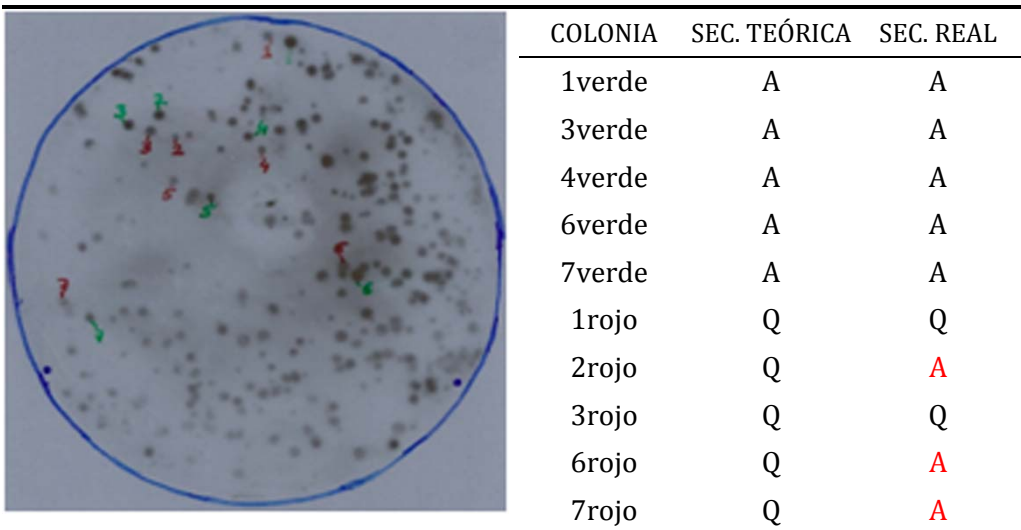


FIGURA 38. Cribado de colonias a partir de una población de bacterias que expresan CTD_{wt} o CTD-Q192A. La población contenía proporciones similares de bacterias que expresan una o la otra variante de CTD. Tras el plaqueo, réplica en filtro de nitrocelulosa, e inmunodetección se analizó la autorradiografía (izquierda) y se seleccionaron varias de las colonias que produjeron una señal más intensa que las de su alrededor (numeradas en verde), y varias de las colonias que produjeron una señal menos intensa que las de su alrededor (numeradas en rojo). Se aisló el ADN plasmídico y se secuenció la región correspondiente a CTD. A la derecha se muestra una tabla en la que se resume el resultado de la secuenciación. Algunas colonias adicionales seleccionadas dieron secuencias ambiguas en la secuenciación. En este experimento, el porcentaje de aciertos fue del 70%. En otros experimentos (no mostrados), el porcentaje de aciertos llegó al 80% para las colonias que expresan CTD mutante de mayor afinidad por CA, y al 100% para aquellas que expresan CTD sin mutar de menor afinidad por CA.

La combinatorialización de CTD se realizó como se describe en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos. La secuenciación de la región combinatorializada en el gen de CTD en la población heterogénea de bacterias obtenida reveló secuencias ambiguas en las 6 posiciones combinatorializadas (Fig. 39), lo que indicaba que la combinatorialización había sido correcta. A partir de esta población se aislaron 20 colonias y se secuenció la región correspondiente a CTD en los correspondientes plásmidos recombinantes (Tabla 7). De los 20 clones sólo tres resultaron ser wt, y otros tres presentaron inserciones o deleciones de nucleótidos que en general alteraban el marco de lectura. La mayoría de clones (70%) mostraron diferentes secuencias combinatorializadas en las 6 posiciones elegidas.

Como es tónica general en bibliotecas combinatoriales de proteínas, se observaron sesgos en el tipo y distribución de mutaciones en los 20 clones de muestra que se secuenciaron. En este caso, se observó un exceso de glicinas y prolinas en las posiciones combinatorializadas, y un menor número de mutaciones en las posiciones 191, 192 y 193 que en las otras tres.

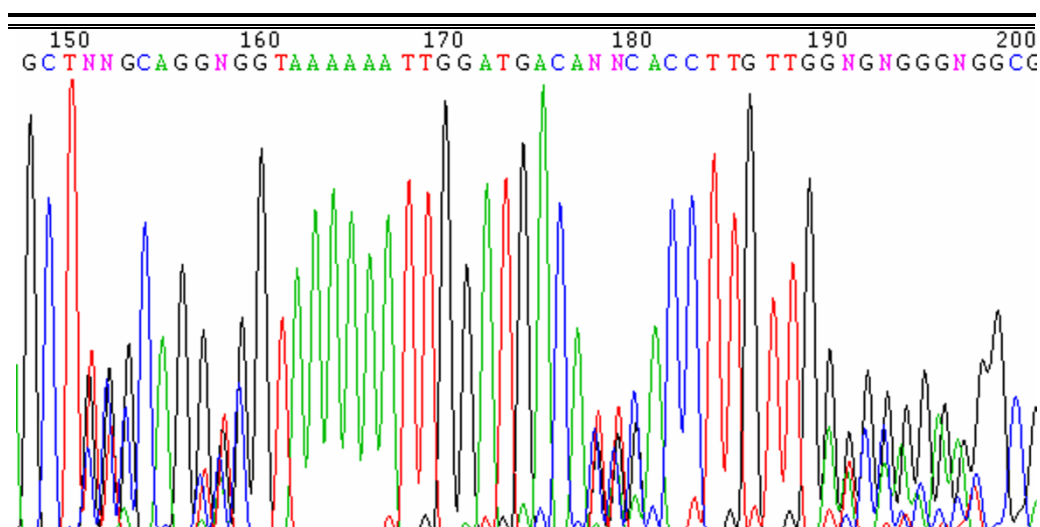


FIGURA 39. Análisis de la secuencia de la región de CTD combinatorializada en una biblioteca de plásmidos pETAflAvr. Las posiciones combinatorializadas corresponden a los nucleótidos numerados 151-53 (S178); 157-59 (E180); 178-80 (E187); 190-92 (V191); 193-95 (Q192); 196-98 (N193).

TABLA 7. Residuos aminoácidos encontrados en posiciones combinatorializadas en CTD expresados por algunos clones moleculares de una biblioteca de pETAflAvr.

Clon molecular	178	180	187	191	192	193	Mut.acompañantes
wt	S	E	E	V	Q	N	no
1	G	G	A	K	K	K	no
2	A	P	T	K	D	R	no
3	S	E	E	V	Q	N	no
4	N	T	G	G	G	E	inserción+delección
5	G	Y	E	V	Q	N	no
6	S	E	E	V	Q	N	no
7	S	E	N	E	Q	K	no
8	G	G	P	T	P	P	no
9	R	L	L	P	P	P	no
10	G	G	G	G	G	G	no
11	S	P	P	V	Q	N	no
12	G	W	R	G	R	E	no
13	T	P	G	V	Q	N	no
14	-	-	-	-	-	-	inserción
15	G	G	G	V	Q	N	no
16	G	L	L	V	Q	N	no
17	G	G	G	V	Q	N	no
18	E	G	R	G	W	G	no
19	E	P	P	V	K	N	no
20	S	E	E	V	Q	N	no

Esta biblioteca combinatorial se sometió al proceso de cribado de colonias como se indica en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos para identificar los variantes de CTD en la población que tuvieran mayor afinidad por CA. En cada placa Petri se seleccionaron las colonias que rindieron una mayor intensidad de señal en la autorradiografía (entre una y trece colonias). En este primer proceso se cribaron en total aproximadamente 10.000 colonias, de las que se seleccionaron 87 clones distintos. La secuencia de la región de CTD se determinó para cada uno de estos 87 clones. En la Tabla 8 se muestra un resumen de los residuos encontrados en cada una de las posiciones combinatorializadas. En la muestra de CTDs combinatorializadas expresadas por la población de bacterias se observan los mismos sesgos que en la biblioteca de plásmidos recombinantes. Pese a estos sesgos, se observó una gran diversidad en los aminoácidos presentes en cada posición combinatorializada, y una gran diversidad en las combinaciones de mutaciones obtenidas. No se observó en estos 87 clones de muestra ningún tipo de patrón que nos permitiera discriminar una preferencia de unión de algún tipo de secuencia.

TABLA 8. Frecuencias de diferentes aminoácidos en las posiciones de CTD combinatorializadas, obtenidas a partir de 87 colonias preseleccionadas.

Posición					
S178	E180	E187	V191	Q192	N193
S ₂₅	E ₂₀	E ₁₇	V ₃₄	Q ₃₃	N ₄₃
L ₁₉	L ₁₆	L ₁₉	G ₁₀	G ₁₂	G ₉
G ₁₂	P ₁₃	G ₁₃	K ₉	K ₆	K ₅
P ₁₀	G ₁₁	P ₁₁	T ₆	P ₄	P ₅
F ₅	F ₇	H ₅	L ₄	L ₄	E ₄
V ₂	V ₄	F ₄	F ₄	V ₃	R ₃
E ₂	R ₃	R ₃	E ₃	H ₃	L ₂
T ₂	T ₂	V ₂	N ₃	F ₂	F ₁
K ₁	Y ₁	M ₂	I ₂	E ₂	M ₁
M ₁	D ₁	W ₂	W ₁	T ₂	A ₁
A ₁	H ₁	A ₁	M ₁	R ₂	D ₁
H ₁	W ₁	S ₁	A ₁	M ₁	T ₁
R ₁	I ₁	C ₁	Y ₀	Y ₁	W ₁
W ₁	S ₁	K ₀	D ₀	A ₁	S ₁
Y ₀	M ₀	Y ₀	P ₀	D ₀	Q ₁
D ₀	K ₀	D ₀	H ₀	W ₀	V ₀
I ₀	A ₀	T ₀	R ₀	I ₀	H ₀
C ₀	C ₀	I ₀	S ₀	S ₀	Y ₀
N ₀	N ₀	N ₀	C ₀	C ₀	I ₀
Q ₀	Q ₀	Q ₀	Q ₀	N ₀	C ₀

A continuación se utilizaron estos 87 clones variantes para llevar a cabo un segundo proceso de identificación de los variantes con mayor afinidad por CA, sembrándolos de forma ordenada todos juntos en una misma placa, utilizando como controles CTD_{wt}, CTD-Q192A (controles positivos) y CTD-W184A (control negativo que no interacciona con CA), y llevando a cabo un nuevo ensayo de cribado de colonias. Este experimento se llevó a cabo dos veces, utilizando tres placas Petri cada vez para realizar un triplicado. En cada experimento independiente sólo se consideraron positivas aquellas colonias que dieron una señal intensa en las tres placas, y sólo se seleccionaron finalmente como positivas las que lo fueron en los dos experimentos independientes (Fig. 40). Se seleccionaron así cuatro CTD mutantes para los que todos los ensayos de cribado indicaban una interacción intensa con CA no mutada. Las secuencias de estos 4 mutantes se indican en la Tabla 9.

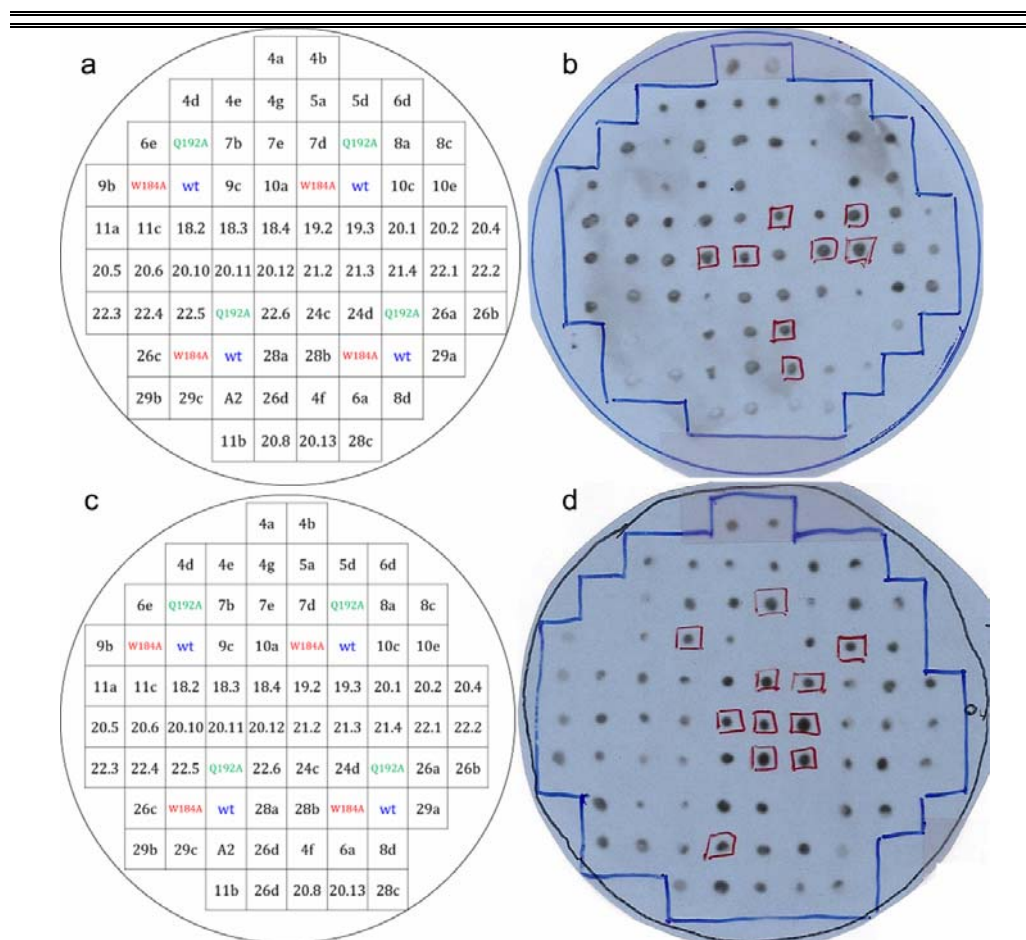


FIGURA 40. Cribado de colonias a partir de una población de bacterias que expresan una biblioteca combinatorial del domino CTD. Para una descripción completa del experimento, ver texto. (a, b) Primer experimento; (c, d), segundo experimento. En (a) o (c) se muestra un esquema de una placa sembrada con colonias preseleccionadas en un primer paso de cribado y en (b) o (d) la autorradiografía de uno de los triplicados del primer (b) o del segundo experimento (d).

TABLA 9. Residuos aminoacídicos encontrados en posiciones combinatorializadas en CTDs expresados por clones moleculares de una biblioteca de pETAflAvr^a.

Clon molecular	178	180	187	191	192	193
wt	S	E	E	V	Q	N
19b	S	E	P	G	G	G
20.12	P	T	A	V	Q	N
21.3	L	F	F	V	Q	N
24d	S	E	E	M	Y	L

^a Ninguna de las colonias presenta mutaciones acompañantes, deleciones ni inserciones.

Los clones que expresaban estos CTD mutantes se amplificaron en cultivo para tratar de expresar la proteína en cantidad elevada. Para tres de ellos no fue posible obtener una expresión elevada. Una posibilidad es que estos tres mutantes, aunque posean una relativamente alta afinidad por CA, sean intrínsecamente inestables y resulten degradados en la bacteria durante la expresión a gran escala. El cuarto mutante, denominado CTD-19b, se expresó en cantidad adecuada (Fig. 41a), y pudo ser purificado (Fig. 41b).

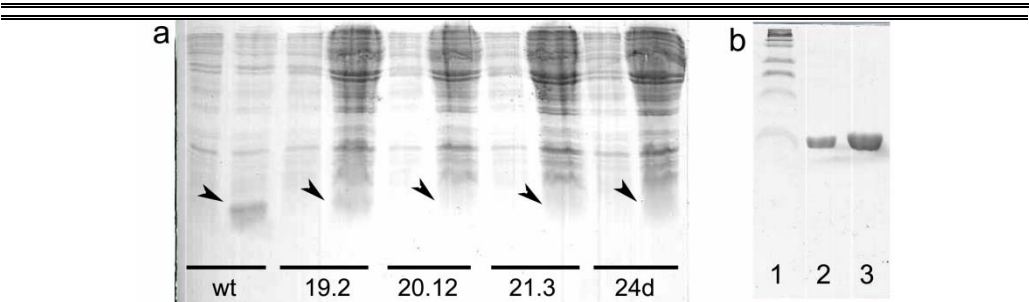


FIGURA 41. SDS-PAGE de los extractos obtenidos en la purificación de CTD mutantes seleccionados por el método de cribado de colonias (a) y purificación de CTD-19b (b). (a) A partir de cada una de las colonias seleccionadas mediante el método de cribado de colonias se creció un cultivo. Se muestra un gel de SDS-PAGE al que se han aplicado 10 μ l de cada uno de los cultivos antes de la inducción con IPTG (calle izquierda) y después de tres horas de incubación tras la inducción con IPTG (calle derecha). Las puntas de flecha marcan la posición de CTD. (b) Tras la purificación de CTD-19b se comprobó su pureza aplicando 10 μ l de la solución de proteína a un gel SDS-PAGE (calle 2) y 10 μ l de CTD_{wt} como control (calle 3). En la calle 1 se aplicó un conjunto de marcadores de peso molecular.

4.3. Caracterización del mutante CTD-19b obtenido a partir de una biblioteca combinatorial semi-racional mediante cribado de colonias

El proceso de cribado de unas 10.000 colonias que expresan variantes combinatoriales de CTD condujo a la identificación y purificación de un variante de CTD con 4 mutaciones en la interfase de dimerización, que se encontraba entre aquellos de la biblioteca que presumiblemente presentan mayor afinidad por CA. Hemos realizado una caracterización bioquímica preliminar de este mutante y comparado su capacidad de inhibir el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1 con la de CTD no mutado.

Análisis de la estructura secundaria de CTD-19b mediante espectroscopía DC en el UV lejano. La determinación de la estructura secundaria de CTD-19b a concentraciones de 1 μ M o 20 μ M mediante espectroscopía DC (Fig. 42) indica que la proteína se encuentra plegada y presenta la misma estructura secundaria que CTD_{wt} (Mateu 2002). El espectro DC de CTD-19b a elevada concentración (200 μ M) fue algo diferente (no mostrado), pero junto con el análisis de fluorescencia (ver a continuación) puede interpretarse como debido a cierta agregación a elevadas concentraciones.

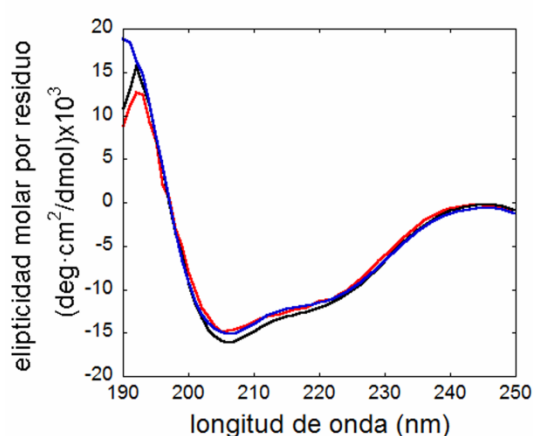


FIGURA 42. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano del mutante de CTD-19b. Se utilizó CTD_{wt} a 20 μ M como control (línea negra) y concentraciones de CTD-19b de 1 μ M (línea roja) y 20 μ M (línea azul) en 25 mM fosfato sódico pH7,4, a una temperatura de 25°C. Las curvas mostradas corresponden al promedio de cuatro espectros individuales.

Análisis del entorno del triptófano 184 en CTD-19b mediante espectroscopía de fluorescencia. El único triptófano presente en CTD_{wt}, se encuentra enterrado en la interfase de dimerización, y constituye una sonda que permite determinar el entorno de este residuo, que depende en gran medida del estado monomérico o dimérico de la proteína (Mateu 2002). Se realizaron espectros de fluorescencia intrínseca de triptófano para CTD-19b a diferentes concentraciones de proteína, que se compararon con los correspondientes a CTD_{wt} (Fig. 43). Para ambas proteínas el máximo de fluorescencia se desplazó hacia longitudes de onda mayores cuando se compararon los espectros obtenidos a 1 μ M y a 20 μ M. La comparación de los espectros de fluorescencia de ambas

proteínas a la misma concentración resultaron esencialmente idénticos, tanto a 1 μM como a 20 μM (Figs. 43a y 43b). A 200 μM el espectro de CTD-19b presentó un claro desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda menores que correspondió con el desplazamiento observado para CTD_{wt}, aunque con una intensidad ligeramente menor (Fig. 43c). Los resultados indican que CTD-19b, como CTD_{wt}, es capaz de oligomerizar a través de una interfase que produce el enterramiento de W184 en la misma medida.

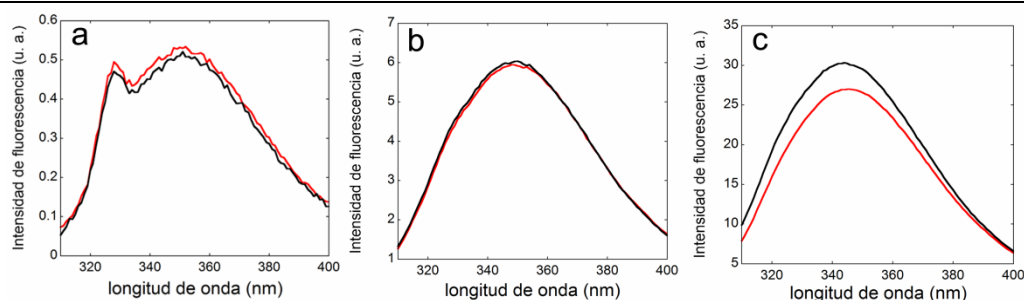


FIGURA 43. Espectros de emisión de fluorescencia del mutante CTD-19b. Comparación de los espectros de CTD_{wt} (línea negra) y CTD-19b (línea roja) a concentraciones de CTD de 1 μM (a), 20 μM (b) o 200 μM (c). La proteína se encontraba disuelta en 25mM fosfato sódico pH7,4, y a una temperatura de 25°C. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm. Las curvas mostradas corresponden al promedio de diez espectros individuales.

Análisis del estado y afinidad de oligomerización de CTD-19b mediante filtración en gel analítica: El último paso en la purificación preparativa de CTD-19b consistió en una cromatografía de filtración en gel. El volumen de elución fue muy similar al obtenido para CTD_{wt} utilizando la misma columna, lo que indicaba que CTD-19b es capaz de homodimerizar, del mismo modo que lo es la proteína no mutada de la que deriva. No se observaron más estados oligoméricos de esta proteína a pesar de su elevada concentración.

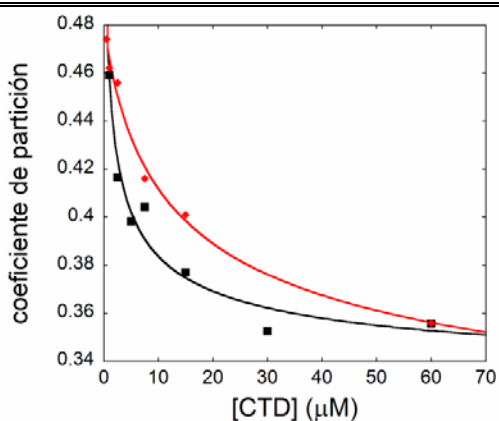


FIGURA 44. Determinación de la constante de afinidad de dimerización de CTD-19b mediante cromatografía analítica de filtración en gel. Se indica el coeficiente de partición obtenido a diferentes concentraciones de proteína total, utilizando CTD_{wt} como control (línea negra) o el variante combinatorial CTD-19b (línea roja). El análisis se realizó mediante elución frontal en 25 mM fosfato sódico pH7,4, 150 mM NaCl a 25°C.

A continuación, se determinó la afinidad de homodimerización de CTD-19b mediante cromatografía de filtración en gel analítica, tanto en experimentos de elución frontal como zonal, como se ha descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos. En paralelo se llevó a cabo la filtración en gel analítica de CTD_{wt} como control (Fig. 44). La constante de afinidad de dimerización determinada para CTD-19b en ambas condiciones resultó ser similar a la obtenida para CTD_{wt} (Tabla 10).

TABLA 10. Comparación de la afinidad de dimerización entre CTD_{wt} y CTD-19b^a.

Proteína	$K_{dis}(\mu\text{M})^b$	$\Delta G_{dis}(\text{kcal/mol})$	$\Delta\Delta G_{dis}(\text{kcal/mol})$
CTD _{wt}	8 ± 2	$-1,2 \pm 0,3$	--
CTD-19b	27 ± 9	$-1,9 \pm 0,7$	-0,7

^a K_{dis} , constante de equilibrio de disociación; ΔG_{dis} , energía libre de la disociación; $\Delta\Delta G_{dis}$, variación en ΔG_{dis} entre CTD_{wt} y el mutante CTD-19b.

^b La determinación de la K_{dis} se hizo también mediante filtración en gel analítica con elución zonal. En ese caso las constantes de disociación fueron de $K_{dis}(\text{CTD}_{wt}) = 22 \pm 4 \mu\text{M}$ y de $K_{dis}(\text{CTD-19b}) = 31 \pm 10 \mu\text{M}$

Inhibición por CTD-19b del ensamblaje in vitro de la cápsida madura de VIH-

1. El objetivo principal por el que habíamos realizado intentos de combinatorialización, primero de los péptidos CAC1 y CAI y luego del dominio CTD, era tratar de identificar sustituciones de aminoácidos que incrementaran la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1. Por tanto, como última y más importante etapa de esta caracterización del único variante combinatorial obtenido hasta el momento, CTD-19b, ensayamos su capacidad de inhibición del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 en nuestro ensayo estándar, en presencia de un agente aglomerante (Fig. 45).

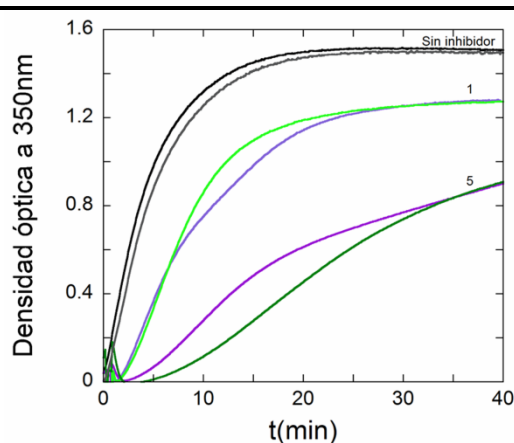


FIGURA 45. Inhibición de la polimerización de CA por CTD-19b. Se siguió la reacción de ensamblaje de CA en partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 mediante la medida de la densidad óptica a 350 nm en función del tiempo, en ausencia de inhibidor (trazo negro), o en presencia de un péptido sin actividad inhibitoria a una relación molar péptido : CA de 10 (trazo gris); de CTD_{wt} (trazo morado); o de CTD-19b (trazo verde). Junto a cada curva se indica la relación molar inhibidor : CA utilizada (1 o 5). Las demás condiciones fueron las mismas que en el experimento de la Figura 22. Se muestra un experimento representativo cuyos resultados se han repetido en experimentos independientes.

CTD-19b resultó capaz de inhibir eficazmente el ensamblaje de la cápsida, presentando una actividad comparable, pero no superior, a la de CTD_{wt}.

En resumen, el variante de CTD analizado entre los que presentaron una mayor afinidad por CA es capaz de plegarse, formar homodímeros e inhibir eficazmente el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1, pero tanto su afinidad de dimerización como su actividad inhibitoria del ensamblaje son similares, no superiores a la de CTD no mutado. A pesar de que no hemos identificado aún un variante combinatorial de mayor afinidad, es importante destacar el hecho de que el variante CTD-19b resultó tan activo como el CTD no mutado, pese a la naturaleza drástica de las mutaciones introducidas en la hélice. Este resultado inicial abre camino a un estudio biofísico y bioquímico de las diferentes soluciones estructurales que permiten el funcionamiento de una interfase que participa en el ensamblaje de una cápsida vírica (ver Discusión).

5. Estudio biofísico y bioquímico de la reacción de dimerización alternativa de CTD (mutante $\Delta 177$) mediante intercambio de dominios

El estudio biofísico y bioquímico de las reacciones de oligomerización entre subunidades de cápsidas víricas es importante para el entendimiento de la morfogénesis viral y para el diseño racional o semi-racional de inhibidores del ensamblaje (ver, por ejemplo, el apartado 3 de Resultados). La capacidad del dominio CTD de CA de VIH-1 para dimerizar en solución a través de la misma interfase discreta que participa en el ensamblaje de la cápsida madura suministró una oportunidad inusual para nuestro estudio bioquímico y termodinámico detallado de una reacción de oligomerización implicada en el ensamblaje de una cápsida vírica (Mateu, 2002). Como objetivo final de esta tesis, consideramos de interés realizar un estudio similar sobre la recientemente descrita reacción alternativa de dimerización de CTD mediante intercambio de dominios (Ivanov, *et al.*, 2007), y del posible papel funcional de la región MHR de CA en esta interfase.

Como se ha indicado en el apartado 5 de la Introducción, este modo alternativo de dimerización de CTD en solución resulta favorecido, con respecto al modo normalmente observado en solución y en la cápsida madura, cuando se deleciona artificialmente el residuo 177 de CA para obtener el dominio mutante CTD- $\Delta 177$. En el trabajo original (Ivanov, *et al.*, 2007) se determinó la estructura del dímero de CTD- $\Delta 177$, pero no se realizó una caracterización bioquímica de su reacción de plegamiento y dimerización. Para este trabajo hemos contado con la importante ayuda científica y técnica del Ldo. Miguel Ángel Fuertes de nuestro laboratorio.

5.1. Estudio espectroscópico del monómero y el dímero de CTD-Δ177 y análisis termodinámico de la reacción de plegamiento del monómero

En el estudio de (Ivanov, *et al.*, 2007) se encontró que la expresión de CTD-Δ177 daba lugar a una mezcla de las formas dimérica y monomérica, que se interconvertían muy lentamente. Para caracterizar termodinámicamente el monómero de CTD-Δ177, es decir el estado inicial del proceso de dimerización que queríamos investigar, expresamos y purificamos como se describe en el apartado 6.4 de Materiales y Métodos el mutante CTD-Δ177 (correspondiente a la cepa pNL4.3 utilizada en el trabajo de (Ivanov, *et al.*, 2007)), y separamos mediante cromatografía de filtración en gel preparativa la forma monomérica de la dimérica. La lenta interconversión entre las dos formas permitió una caracterización biofísica de cada forma inmediatamente tras su separación, en la virtual ausencia de la otra forma. Para este estudio se siguieron las mismas aproximaciones espectroscópicas que habíamos utilizado para el estudio de la reacción de dimerización sin intercambio de dominios de CTD_{wt} (Mateu, 2002).

Determinación de la estructura secundaria del monómero y el dímero de CTD-Δ177. Se realizaron por separado espectros de DC en el UV lejano del monómero y del dímero de CTD-Δ177 (Fig. 46). Ambos espectros, propios de una proteína con un elevado contenido en hélice, resultaron indistinguibles entre sí, e igualmente indistinguibles de los espectros obtenidos para el monómero y el dímero de CTD_{wt} (Mateu, 2002). Por tanto, la estructura secundaria del monómero de CTD-Δ177 es esencialmente la misma que la del monómero de CTD_{wt}, y se mantiene en el dímero, del mismo modo que lo hace en el dominio no mutado.

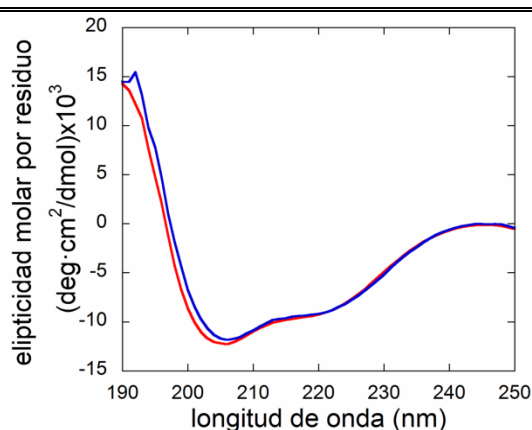


FIGURA 46. Espectro de dicroísmo circular del monómero y el dímero de CTD-Δ177. Se compararon los espectros de DC del dímero (rojo) y el monómero (azul) de CTD-Δ177. Ambos se tomaron utilizando una concentración de proteína de 20 μM en tampón 25 mM fosfato sódico pH 7,4.

Determinación del entorno del triptófano 184 en el monómero y el dímero de CTD-Δ177. Se realizaron por separado espectros de fluorescencia intrínseca de triptófano

del monómero y del dímero de CTD- Δ 177 (Fig. 47a). Aunque se observa una intensidad de emisión de fluorescencia algo menor en el espectro del dímero, en ambos espectros el máximo de emisión corresponde a una longitud de onda de aproximadamente 350 nm. Por tanto, tanto en el monómero como en el dímero de CTD- Δ 177 el único triptófano, W184, se encuentra completamente expuesto al solvente; lo mismo que en el monómero, pero no en el dímero, de CTD_{wt} (Mateu 2002). Para comprobar que el grado de exposición al solvente era máximo tanto en el monómero como en el dímero de CTD- Δ 177, se añadieron concentraciones crecientes de GdmHCl como desnaturizante (hasta 5 M) y se determinó en cada caso la intensidad de fluorescencia a 350 nm, sin que se observara ninguna variación significativa de la misma, ni en el monómero ni en el dímero (Fig. 47b). Estos resultados son consistentes con las diferentes estructuras de los dímeros CTD_{wt} (W184 queda enterrado en la interfase de dimerización formada sin intercambio de dominios) y CTD- Δ 177 (W184 queda expuesto al solvente como en el monómero, sin participar en la interfase de dimerización alternativa formada por intercambio de dominios).

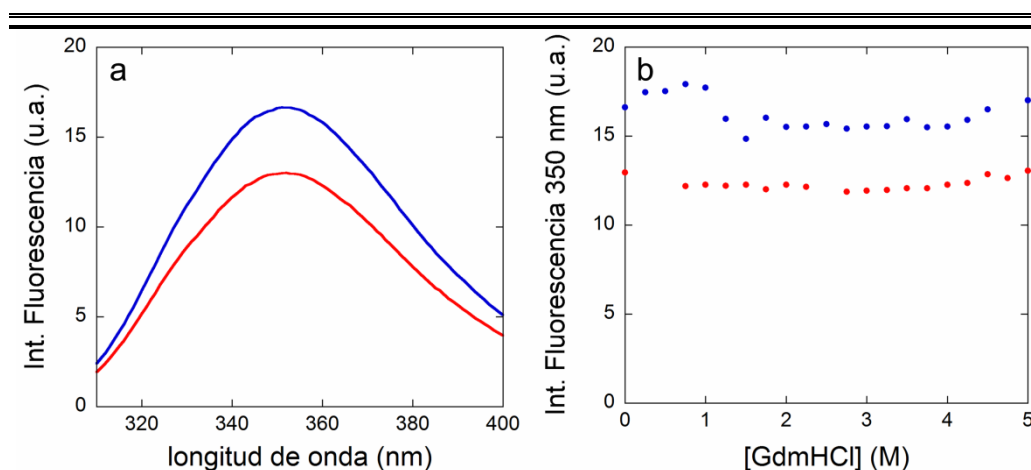
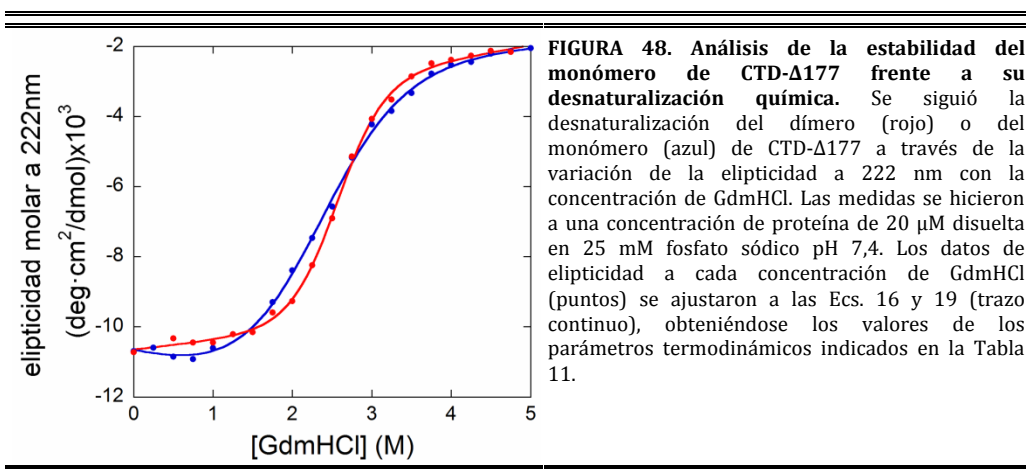


FIGURA 47. Análisis del entorno del W184 en el dímero y el monómero de CTD- Δ 177 mediante fluorescencia. (a) Se compararon los espectros de emisión de fluorescencia del dímero (rojo) y el monómero (azul) de CTD- Δ 177. Ambos se tomaron utilizando una concentración de proteína de 20 μ M en tampón 25 mM fosfato sódico pH 7,4. (b) Intensidad de emisión de fluorescencia a 350 nm en función de la concentración de GdmHCl por el dímero (rojo) o el monómero (azul) de CTD- Δ 177. Se utilizó una concentración de proteína de 20 μ M en 25 mM fosfato sódico pH 7,4.

Determinación de la estabilidad termodinámica del monómero de CTD- Δ 177 en experimentos de desnaturalización química. La desnaturalización química de CTD- Δ 177 en presencia de GdmHCl se siguió mediante espectroscopía DC, tal como se describe en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Se utilizaron tanto la forma monomérica pura como la forma dimérica pura. Puesto que ambas formas de CTD- Δ 177 presentan el mismo espectro de DC en el UV lejano, el proceso de dimerización de CTD- Δ 177 es invisible para esta técnica, que permite por tanto seguir específicamente el equilibrio de de

desplegamiento/plegamiento del monómero, como ocurre para CTD_{wt} (Mateu, 2002). Por tanto, en ambos casos (monómero o dímero) deberían obtenerse los mismos valores para los parámetros termodinámicos.

En cada caso, el valor de elipticidad molar a 222 nm se representó frente a la concentración de GdmHCl (Fig. 48). Las curvas se ajustaron a las ecuaciones 16 y 19, correspondientes a una transición unimolecular monómero nativo-monómero desnaturalizado, como se indica en el apartado 11.1 de Materiales y Métodos, lo que nos permitió obtener los parámetros termodinámicos del equilibrio de plegamiento del monómero (Tabla 11). Como se esperaba, el valor de $[Gd]_{50\%}$ fue indistinguible en ambos casos, y muy similar al obtenido para el equilibrio de plegamiento de CTD_{wt}. La extrapolación lineal de los valores de ΔG_u obtenidos a diferentes concentraciones de GdmHCl a la ausencia de desnaturalizante permitió obtener un valor de $\Delta G_u^{H2O} = 5,1 \pm 0,2$ kcal/mol similar (dentro de los errores cometidos en la extrapolación) al obtenido en las mismas condiciones para CTD_{wt}.



Determinación de la estabilidad termodinámica del monómero de CTD-Δ177 en experimentos de desnaturalización térmica. El monómero de CTD-Δ177 se sometió a desnaturalización térmica como se describe en el apartado 11 de Materiales y Métodos. El valor de elipticidad a 222 nm se representó frente a la temperatura, y los puntos experimentales se ajustaron a la ecuación correspondiente a una transición unimolecular monómero nativo-monómero desnaturalizado (Fig. 49). Los parámetros termodinámicos se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones 18 y 19 (Tabla 11). Los valores obtenidos para la $T_m = 62,7 \pm 0,2$ °C y $\Delta H_u^{H2O} = 38 \pm 2$ kcal/mol correspondientes al proceso de desnaturalización térmica de CTD-Δ177 resultaron muy similares a los obtenidos para CTD_{wt}.

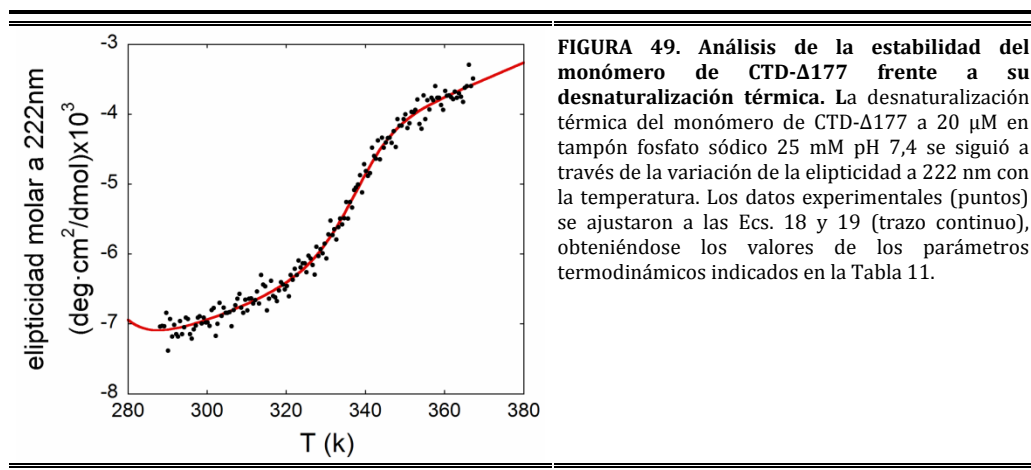


FIGURA 49. Análisis de la estabilidad del monómero de CTD-Δ177 frente a su desnaturalización térmica. La desnaturalización térmica del monómero de CTD-Δ177 a 20 μM en tampón fosfato sódico 25 mM pH 7,4 se siguió a través de la variación de la elipticidad a 222 nm con la temperatura. Los datos experimentales (puntos) se ajustaron a las Ecs. 18 y 19 (trazo continuo), obteniéndose los valores de los parámetros termodinámicos indicados en la Tabla 11.

TABLA 11. Parámetros termodinámicos obtenidos para CTD-Δ177 en experimentos de desnaturalización química o térmica^a.

Proteína	ΔG_u^{H2O} (kcal/mol) ^b	m (kcal/mol) ^c	[Gd] _{50%} (M) ^d	T_m (°C) ^e	ΔH_u^{H2O} (kcal/mol) ^f
CTD _{wt}	4,4 ± 0,1	1,92 ± 0,04	2,29 ± 0,01	63,1 ± 0,04	45,0 ± 0,4
CTD-Δ177	5,1 ± 0,2	1,95 ± 0,07	2,62 ± 0,01	62,7 ± 0,2	38 ± 2

^a La concentración de proteína a la que se hicieron las medidas fue de 20 μM (monómero).

^b ΔG_u^{H2O} , energía libre de desnaturalización extrapolada en ausencia de desnaturalizante.

^c m , variación en la energía libre de desnaturalización con la concentración de desnaturalizante.

^d [Gd]_{50%}, concentración de desnaturalizante a la que el 50% de la proteína está desnaturalizada.

^e T_m , temperatura de transición de la desnaturalización térmica.

^f ΔH_u^{H2O} , variación en la entalpía de desnaturalización a la temperatura de transición.

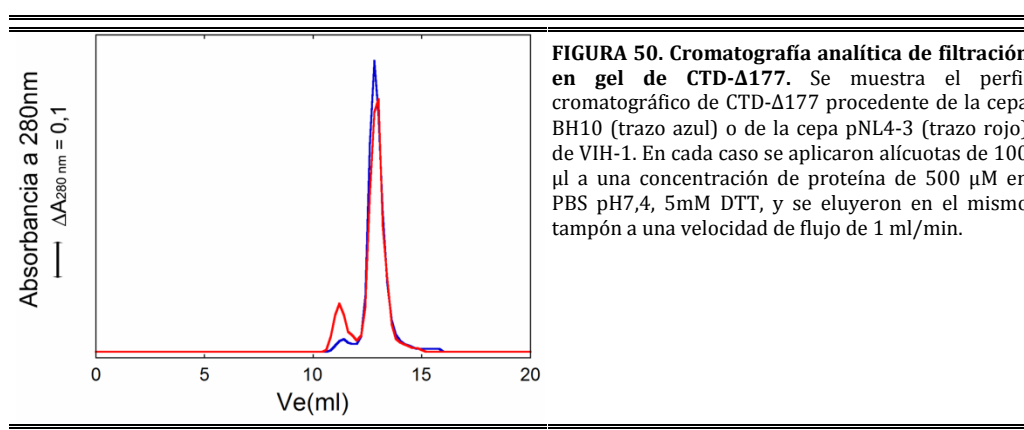
Los errores que se indican para cada valor son errores de ajuste.

En resumen, los resultados obtenidos indican que el monómero de CTD-Δ177 y el monómero de CTD_{wt} presentan la misma estructura secundaria, la misma exposición de W184 al solvente (indicativa de la misma estructura terciaria al menos en el entorno de W184), y la misma estabilidad conformacional frente a la desnaturalización térmica o química. Por tanto, resulta muy probable que ambos monómeros presenten esencialmente el mismo plegamiento y la misma estructura terciaria excepto muy localmente, en la región del bucle expuesto al solvente donde se encuentra el residuo 177 en CTD_{wt} que ha sido deletado en CTD-Δ177. Las diferencias conformacionales entre las dos proteínas se presentan únicamente al dimerizar.

5.2. Estudio termodinámico y cinético de la reacción de dimerización de CTD-Δ177 mediante intercambio de dominios

Equilibrio de dimerización de CTD-Δ177. En primer lugar nos planteamos si este equilibrio de dimerización ocurría en CTD-Δ177 proveniente de diversas cepas de VIH-1. Para ello obtuvimos, como se describe en el apartado 6.4 de Materiales y Métodos, mutantes CTD-Δ177 correspondientes a las cepas pNL4.3 (la utilizada en el trabajo de (Ivanov, *et al.*, 2007) y BH10 (la que utilizamos normalmente en nuestro laboratorio). CTD de ambas cepas se diferencian exclusivamente en el residuo 208 (Gly en pNL4.3 o Ala en BH10), localizado entre las hélices 10 y 11 de CA, fuera por tanto de ambas interfaces de dimerización de CTD. Los dominios se obtuvieron como proteínas de fusión con GST; tras su liberación mediante digestión con trombina se concentraron hasta 500 μM para favorecer la presencia de la forma dimérica y se almacenaron durante varias semanas de modo que se estuviera seguro de alcanzar el equilibrio químico.

Ambos variantes de CTD-Δ177 altamente purificados se sometieron a cromatografía analítica de filtración en gel (Fig. 50). Los perfiles cromatográficos obtenidos mostraron en ambos casos dos especies con volúmenes de elución correspondientes a pesos moleculares aparentes de 13 kDa y 26 kDa (supuesta una forma esférica para la proteína), correspondientes por tanto a monómero y dímero como se esperaba. La simetría de cada pico y su separación en el cromatograma indican que no existen formas adicionales.



La especie molecular de menor tamaño presentó, para ambos variantes de CTD-Δ177, exactamente el mismo peso molecular aparente que el monómero de CTD_{wt} analizado en la misma columna e idénticas condiciones (Mateu 2002); la forma algo elongada del monómero de CTD da cuenta de la diferencia entre el peso molecular aparente (13 kDa) y el deducido para el monómero de CTD-Δ177 a partir de la secuencia (9,5 kDa). La especie molecular de mayor tamaño de ambos variantes de CTD-Δ177 corresponde claramente a una forma dimérica con un peso molecular aparente algo

mayor que el correspondiente al dímero de CTD_{wt} analizado en la misma columna; la forma más elongada del dímero de CTD-Δ177 producido mediante intercambio de dominios (Ivanov, *et al.*, 2007) da cuenta de la diferencia entre su peso molecular aparente (26 kDa), el del dímero de CTD_{wt}, y el deducido a partir de la secuencia (19 kDa)

Sorprendentemente, y de forma reproducible, la relación dímero/monómero obtenida para los dos variantes fue sustancialmente diferente para la misma concentración total de proteína y en las mismas condiciones de ensayo. En el experimento de la Fig. 50 (un caso representativo), para las variantes BH10 y pNL4.3 la proporción de dímero fue respectivamente del 5% y del 16%, a pesar de la diferencia en un sólo aminoácido en su secuencia. Además, en las condiciones utilizadas y a pesar de la elevada concentración total de proteína, la proporción de dímero fue, en ambos casos, claramente inferior a la de monómero, lo que indica una muy baja afinidad de dimerización. CTD-Δ177 de BH10 también se expresó como proteína libre en vez de proteína de fusión con GST, y se purificó mediante el mismo protocolo que el utilizado para CTD_{wt} (apartado 6.3). En este caso, sólo se obtuvo la forma monomérica, sin observarse cantidad alguna de dímero.

En base a los resultados anteriores decidimos continuar el estudio de esta interfase de dimerización utilizando el variante pNL4.3 de CTD-Δ177, que parece presentar una afinidad de dimerización mayor que la del variante BH10. Las proporciones de dímero obtenidas en las condiciones inicialmente utilizadas eran inferiores a las obtenidas por (Ivanov, *et al.*, 2007), por lo que decidimos analizar si era posible incrementar la afinidad de dimerización mediante alguna modificación en las condiciones del ensayo. Entre las diversas condiciones probadas se incluyeron el pH (pH 5, 7 ó 8 en tampón fosfato, pH 9 en tampón borato), la fuerza iónica (sin añadir sal, o a 1M NaCl) y la presencia de DTT como agente reductor (resultados no mostrados). La mayor proporción de dímero se consiguió utilizando PBS pH 7,4, 5 mM DTT. En estas condiciones, para una concentración de proteína de entre 300 μM y 500 μM se obtuvieron proporciones de dímero en torno al 15%-20%.

Una vez separadas las formas monomérica y dimérica de CTD-Δ177 mediante cromatografía preparativa de filtración en gel, se comprobó que tanto desde la forma monomérica como desde la dimérica se consigue restablecer (muy lentamente) el equilibrio, correspondiente a un 15-20% de dímero y 80-85% de monómero a las concentraciones totales de proteína utilizadas.

La disociación y desnaturalización térmica de una mezcla de monómero y dímero de CTD-Δ177 mediante calentamiento a 95°C y su posterior renaturalización y asociación mediante enfriamiento a 25°C permitió alcanzar mucho más rápidamente el equilibrio químico que manteniendo la proteína a 25°C; sin embargo, la proporción final de dímero y monómero alcanzada fue, como se esperaba, la misma (resultados no mostrados). Por tanto, concluimos que es posible alcanzar un verdadero equilibrio entre el monómero y el dímero, lo que permitía determinar fácilmente la constante de equilibrio como se indica a continuación.

La constante de equilibrio de disociación (K_{dis}) para CTD- $\Delta 177$ se calculó a partir de la determinación directa de las proporciones de dímero y monómero y la concentración total de proteína en distintos experimentos de cromatografía analítica de filtración en gel. En nuestras condiciones usuales (tampón PBS pH 7,4, 5mM DTT, 25°C) la constante aparente de disociación promedio resultó ser $K_{dis} = 2,1 \pm 1$ mM para la variante pNL4.3, y se pudo estimar una K_{dis} de aproximadamente 5 mM para la variante BH10 en las mismas condiciones. Por tanto, CTD- $\Delta 177$ dimeriza con una muy baja afinidad.

Cinéticas de dimerización y disociación de CTD- $\Delta 177$. Como se ha mencionado, tanto la reacción de dimerización a partir del monómero de CTD- $\Delta 177$ como la reacción de disociación a partir del dímero de CTD- $\Delta 177$ son muy lentas, al igual que ocurre en otros dímeros de dominios intercambiados (Rousseau, *et al.*, 2003). Esto permite determinar fácilmente las constantes de velocidad de estas reacciones mediante la determinación de la proporción de ambas especies, dímero y monómero, en función del tiempo; partiendo de preparaciones homogéneas de uno u otro, y utilizando concentraciones lo suficientemente bajas o elevadas para que ocurra la conversión, al menos parcial, de la forma inicial (dímero o monómero puros) en la otra forma (monómero o dímero).

Para determinar las constantes cinéticas de asociación y disociación de CTD- $\Delta 177$ en condiciones de ensayo en las que se obtuvo la mayor afinidad de dimerización (tampón PBS pH 7,4, 5 mM DTT), a 25°C, se separaron mediante filtración en gel preparativa la forma monomérica de la dimérica y se tomó el tiempo 0. A lo largo de horas y días, se tomaron de cada preparación alícuotas de 100 μ l de las fracciones de dímero (a una concentración total de 20 μ M) y monómero (a una concentración total de 300 μ M) que se sometieron, a su vez, a cromatografía de filtración en gel analítica, y se determinaron a cada tiempo las proporciones de monómero y dímero (Fig. 51), como se especifica en el apartado 9 de Materiales y Métodos.

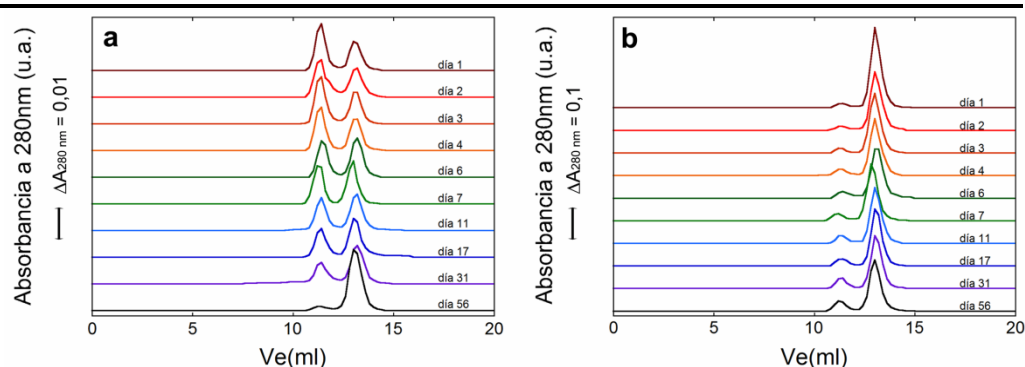


FIGURA 51. Perfiles cromatográficos obtenidos a lo largo del tiempo mediante cromatografía de filtración en gel de la forma dimérica (a) o monomérica (b) de CTD- $\Delta 177$. La concentración de proteína total fue, respectivamente, de 20 μ M o 300 μ M. El resto de las condiciones de la cromatografía fueron como las descritas en la leyenda de la Figura 50.

Cinética de asociación. La cinética de asociación del monómero de CTD-Δ177 (Fig. 52) se ajustó muy bien, como se esperaba, a la ecuación que describe una reacción bimolecular de asociación entre monómeros para dar un dímero. El ajuste no lineal de los datos a la ecuación 5 rindió una constante de velocidad de asociación $k_{as} = (1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 12). A la concentración total de proteína utilizada en estos experimentos (300 μM), la cinética de asociación tendió asintóticamente a una proporción de dímero del 15-20%, alcanzando el equilibrio.

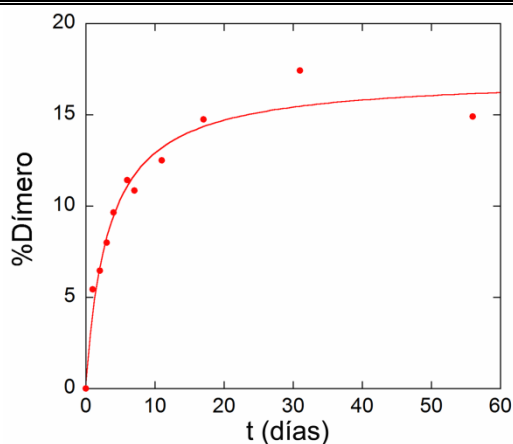


FIGURA 52. Cinética de asociación de CTD-Δ177. Se partió de la forma monomérica recién obtenida y se determinó a partir de los perfiles cromatográficos en la Figura 52b el porcentaje de la forma dimérica presente en función del tiempo. El ajuste de los datos a la Ec. 5 permitió obtener la constante cinética de asociación (Tabla 12).

Cinética de disociación. El proceso de disociación del dímero de CTD-Δ177 (Fig. 53) no pudo ajustarse adecuadamente a una única reacción unimolecular exponencial, correspondiente a un único proceso de disociación unimolecular de un dímero en monómeros. Sin embargo, los datos sí se ajustaron muy bien a una suma de dos procesos unimoleculares exponenciales con diferentes constantes de velocidad (ecuación 11).

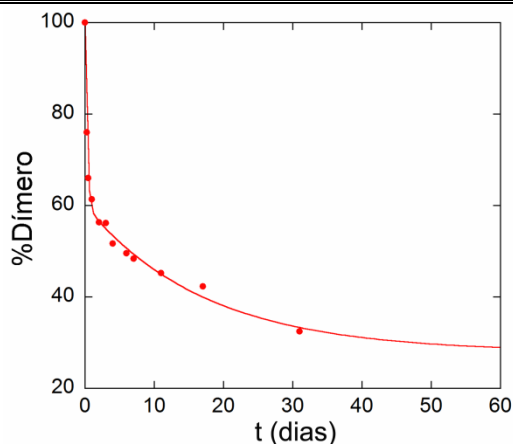


FIGURA 53. Cinética de disociación de CTD-Δ177. Se partió de la forma dimérica recién obtenida y se determinó a partir de los perfiles cromatográficos en la Figura 52a el porcentaje de la forma dimérica presente en función del tiempo. El ajuste de los datos a la Ec. 11 permitió obtener las constantes cinéticas de disociación (Tabla 12) (ver texto).

La reacción más lenta de las dos no parece haberse completado ni después de varias semanas. Del ajuste no lineal de los datos a dos procesos exponenciales se obtuvieron dos constantes de velocidad de disociación, una correspondiente a una reacción menos lenta, $k_{dis1} = (4,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, y otra correspondiente a una reacción del orden de 100 veces más lenta, $k_{dis2} = (7 \pm 2) \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 12). Las constantes de equilibrio de disociación aparentes obtenidas como el cociente k_{dis}/k_{as} para ambos procesos fueron $K_{dis1} = 3,5 \text{ mM}$ y $K_{dis2} = 58 \text{ }\mu\text{M}$. Por tanto, K_{dis1} se corresponde muy bien con la constante aparente de equilibrio obtenida mediante la determinación directa de las proporciones de monómero y dímero de CTD- $\Delta 177$ en el equilibrio; K_{dis2} es dos órdenes de magnitud menor que ellas, y del mismo orden que la obtenida para el equilibrio de dimerización sin intercambio de dominios de CTD_{wt}.

TABLA 12. Comparación de las constantes cinéticas de asociación y disociación de CTD_{wt} y CTD- $\Delta 177$.

Proteína	$k_{as} \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_{dis} \text{ (s}^{-1})$	$K_{dis} \text{ (}\mu\text{M)}$
CTD _{wt} ^a	$(7,95 \pm 0,02) \cdot 10^6$	100 ± 2	$12,1 \pm 0,04$
CTD- $\Delta 177$ ^b	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-7} \text{ }^c$	58
		$(4,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ }^d$	3.500

k_{as} , constante cinética de asociación, k_{dis} , constante cinética de disociación, K_{dis} , constante de equilibrio de disociación, calculada a partir de las dos anteriores. Los errores que se muestran son errores de ajuste.

^a Constantes cinéticas calculadas mediante emisión de fluorescencia en experimentos de flujo detenido.

^b Constantes cinéticas calculadas mediante cromatografía analítica de filtración en gel.

^c Constante cinética del proceso lento en la disociación de CTD- $\Delta 177$.

^d Constante cinética del proceso rápido en la disociación de CTD- $\Delta 177$.

Cinéticas de dimerización y disociación de CTD_{wt}. Debido a la lentitud y aparente presencia de dos equilibrios diferentes de dimerización de CTD- $\Delta 177$, decidimos comparar las cinéticas de asociación y disociación de CTD- $\Delta 177$ con las de CTD_{wt}, que no habían sido determinadas hasta la fecha. El equilibrio de dimerización de CTD_{wt} (en el que no hay intercambio de dominios) es muy rápido y no pueden separarse el dímero y el monómero mediante filtración en gel (Mateu, 2002, del Alamo, et al, 2003). Por tanto, para determinar las cinéticas de asociación y disociación de CTD_{wt} se recurrió a experimentos de flujo detenido (*stopped flow*), que se realizaron como se describe en el apartado 8 de Materiales y Métodos.

Cinética de asociación. Las cinéticas de reasociación del monómero de CTD_{wt} en presencia de diferentes concentraciones de desnaturizante químico (GdmHCl) resultaron tan rápidas que la parte inicial de la reacción se perdió en el tiempo muerto del instrumento. A pesar de ello, los datos obtenidos en repetidos experimentos para cada concentración de desnaturizante se ajustaron bien, como se esperaba, a la ecuación 5

que describe una reacción bimolecular dependiente de la concentración de proteína (Fig. 54). La representación de $\ln(k_{as})$ en función de la concentración de GdmHCl se ajustó a una recta (Fig. 56a). La extrapolación lineal de los valores experimentales de k_{as} a diferentes concentraciones de desnaturante a la ausencia de éste rindió un valor de $k_{as}(\text{H}_2\text{O}) = (7,95 \pm 0,02) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

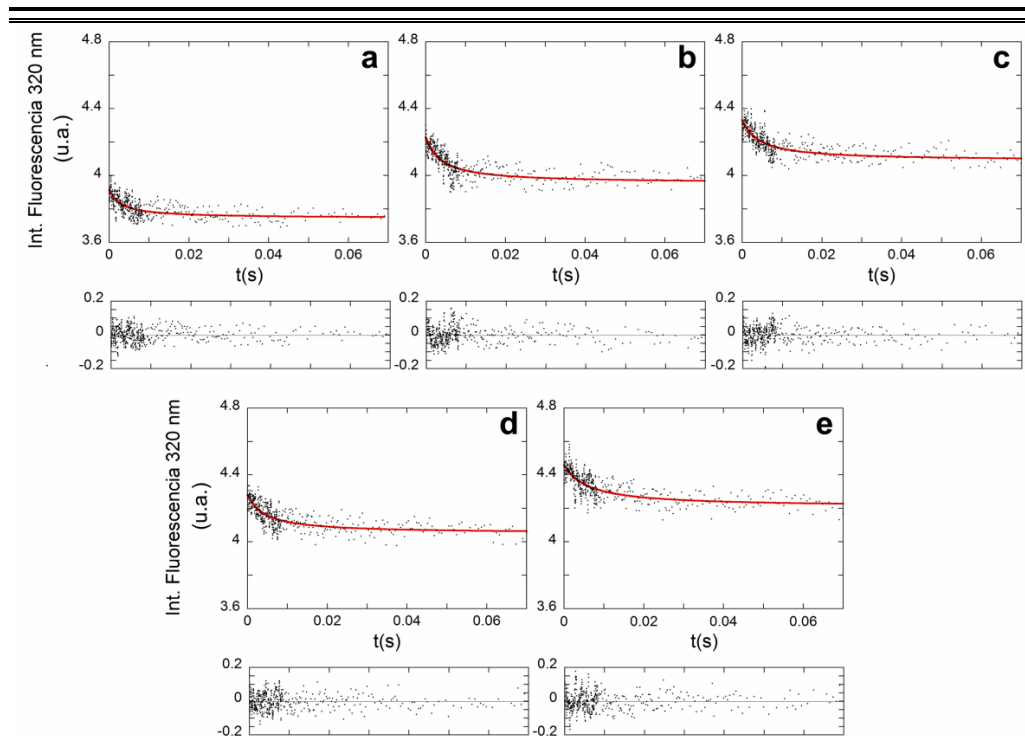


FIGURA 54. Cinéticas de reasociación de CTD_{wt} a distintas concentraciones de GdmHCl. Los experimentos se hicieron a una concentración final de proteína de 50 μM y concentraciones finales de GdmHCl de 0,2 M (a), 0,3 M (b), 0,4 M (c), 0,5 M (d) y 0,6 M (e). Los datos se ajustaron a la Ec. 5 para obtener las constantes cinéticas de asociación a cada concentración de desnaturante. Los paneles inferiores muestran los residuales respecto del ajuste. En cada panel se muestra un experimento representativo. A cada concentración de GdmHCl se hicieron un mínimo de seis experimentos.

Cinética de disociación. Como en el caso de la reacción de asociación, las cinéticas de disociación del monómero de CTD_{wt} en presencia de diferentes concentraciones de desnaturante químico (GdmHCl) resultaron tan rápidas que la parte inicial de la reacción se perdió en el tiempo muerto del instrumento. A pesar de ello, los datos obtenidos en repetidos experimentos para cada concentración de desnaturante se ajustaron bien a la ecuación 4 que describe una reacción unimolecular independiente de la concentración de proteína. Los valores promedio de k_{dis} obtenidos a dos concentraciones diferentes de CTD en presencia de 6,3 M GdmHCl fueron indistinguibles dentro del error experimental ($k_{dis} = 707 \pm 74 \text{ s}^{-1}$ y $k_{dis} = 874 \pm 93 \text{ s}^{-1}$). Para calcular la

constante de disociación en ausencia de desnaturalizante se realizaron experimentos de disociación de CTD a 100 μM a diferentes concentraciones de GdmHCl (Fig. 55). La representación de $\ln(k_{dis})$ en función de la concentración de GdmHCl se ajustó a una recta (Fig. 56b). La extrapolación lineal de los valores experimentales de k_{dis} a diferentes concentraciones de desnaturalizante a la ausencia de éste rindió un valor de $k_{dis}(\text{H}_2\text{O}) = (100 \pm 2) \text{ s}^{-1}$.

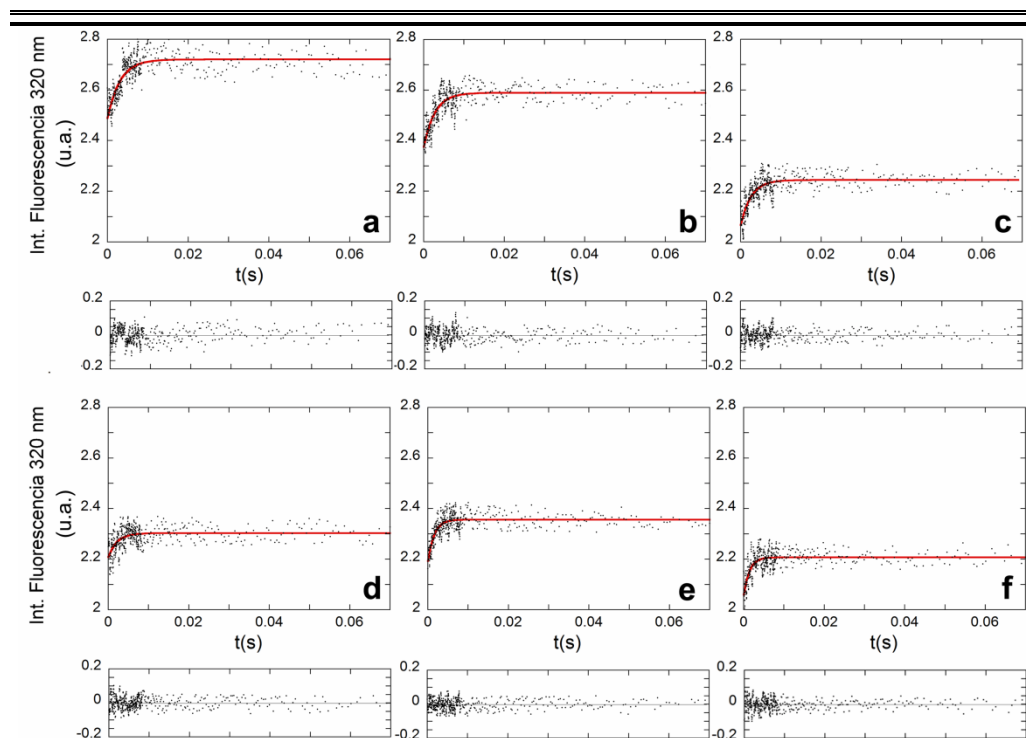


FIGURA 55. Cinéticas de disociación de CTD_{wt} a distintas concentraciones de GdmHCl. Los experimentos se hicieron a una concentración final de proteína de 10 μM y concentraciones finales de GdmHCl de 3,15 M (a), 3,60 M (b), 4,05 M (c), 4,5 M (d), 4,95 M (e) y 5,40 M (f). Los datos se ajustaron a la Ec. 4 para obtener las constantes cinéticas de disociación a cada concentración de desnaturalizante. Los paneles inferiores muestran los residuales respecto del ajuste. En cada panel se muestra un experimento representativo. A cada concentración de GdmHCl se hicieron un mínimo de seis experimentos.

A partir de las constantes cinéticas de asociación y disociación obtenidas como se acaba de indicar se calculó la constante de equilibrio de disociación de CTD como el cociente k_{dis}/k_{as} . La K_{dis} así obtenida fue de $12,10 \pm 0,04 \mu\text{M}$ (Tabla 12), valor muy cercano al obtenido mediante ultracentrifugación analítica ($K_{dis} = 10 \mu\text{M}$) (Gamble, *et al.*, 1997) o filtración en gel analítica ($K_{dis} = 8 \mu\text{M}$) (del Alamo, *et al.*, 2003). Esta coincidencia en el valor obtenido para K_{dis} mediante experimentos cinéticos o mediante métodos de equilibrio confiere validez (a pesar de que la parte inicial de las reacciones se perdió en el

tiempo muerto del experimento) a los valores aproximados obtenidos para las constantes de velocidad de asociación y disociación de CTD_{wt}.

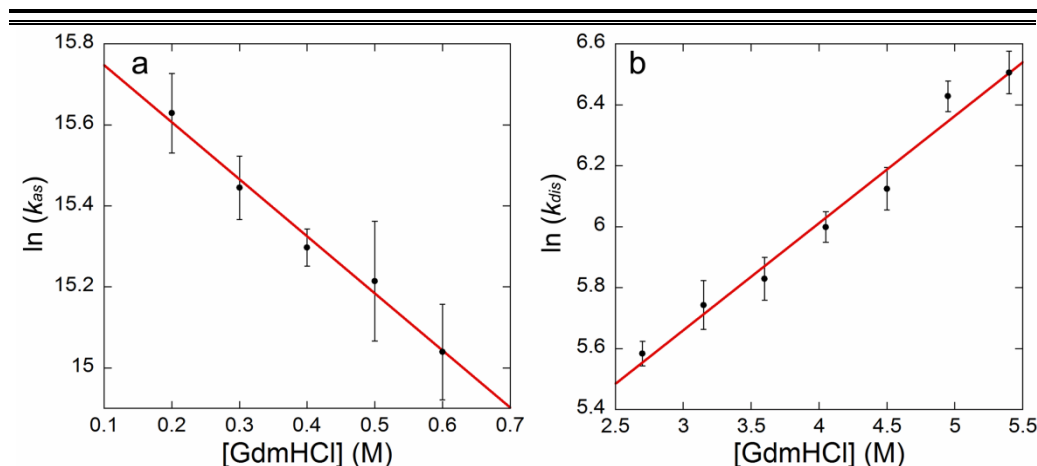


FIGURA 56. Determinación de las constantes de asociación y disociación de CTD_{wt} en ausencia de desnaturalizante. (a) Determinación de la constante de asociación. Los valores de $\ln k_{as}$ obtenidos a diferentes concentraciones de GdmHCl (Fig. 54) se ajustaron a una recta que por extrapolación permitió obtener el valor de k_{as} en ausencia de desnaturalizante: $\ln k_{as} = 15,889 - 1,4094[GdmHCl]$ (b) Determinación de la constante de disociación. Los valores de $\ln k_{dis}$ obtenidos a diferentes concentraciones de GdmHCl (Fig. 55) se ajustaron a una recta que por extrapolación permitió obtener el valor de k_{dis} en ausencia de desnaturalizante: $\ln k_{dis} = 4,6056 + 0,35181[GdmHCl]$

A partir de las constantes cinéticas de asociación y disociación obtenidas como se acaba de indicar se calculó la constante de equilibrio de disociación de CTD como el cociente k_{dis}/k_{as} . La K_{dis} así obtenida fue de $12,10 \pm 0,04 \mu M$ (Tabla 12), valor muy cercano al obtenido mediante ultracentrifugación analítica ($K_{dis} = 10 \mu M$) (Gamble, *et al.*, 1997) o filtración en gel analítica ($K_{dis} = 8 \mu M$) (del Alamo, *et al.*, 2003). Esta coincidencia en el valor obtenido para K_{dis} mediante experimentos cinéticos o mediante métodos de equilibrio confiere validez (a pesar de que la parte inicial de las reacciones se perdió en el tiempo muerto del experimento) a los valores aproximados obtenidos para las constantes de velocidad de asociación y disociación de CTD_{wt}.

En resumen, la dimerización de CTD_{wt} a través de la interfase centrada en la hélice 9 de cada monómero es un proceso extraordinariamente rápido; a pesar de ello, la afinidad de dimerización es baja, del orden de micromolar, porque la disociación del dímero ocurre igualmente de modo extremadamente rápido. El ensamblaje y el desensamblaje de la cápsida madura, en lo que concierne a la dimerización CTD-CTD a través de esta interfase, podrían por tanto ocurrir de modo casi instantáneo. Por el contrario, la dimerización de CTD- $\Delta 177$ a través de la interfase alternativa que implica un intercambio de dominios es un proceso sumamente lento. La afinidad de dimerización es muy baja, del orden de mM, y no lo es aún más porque el proceso de disociación del dímero de dominios intercambiados es un proceso también muy lento (Tabla 12).

5.3. Estudio mutacional de los determinantes moleculares de la dimerización de CTD-Δ177 mediante intercambio de dominios

La interfase de interacción en el dímero de dominios intercambiados de CTD-Δ177 implica a la región MHR de CA. Debido a que mutaciones en la altamente conservada región MHR afectan al ensamblaje de la cápsida inmadura, y a la indefinición de las interfases entre subunidades de CA que participan en la misma, se ha propuesto que la interfase CTD-CTD producida mediante intercambio de dominios podría jugar un papel en el ensamblaje de la cápsida inmadura de VIH-1 (Ivanov, *et al.*, 2007). Esta propuesta predice que los residuos del MHR más conservados y funcionalmente importantes para el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 deberían ser todos ellos importantes para la dimerización de CTD mediante intercambio de dominios. Para analizar los determinantes moleculares de la reacción de dimerización mediante intercambio de dominios y el papel funcional del MHR en esta reacción decidimos mutagenizar a alanina en CTD-Δ177 una serie de residuos implicados en esta interfase. Se eligieron tanto residuos pertenecientes al MHR como otros no situados en el MHR, y se comprobaron los efectos de la eliminación de las interacciones que establecen las cadenas laterales mutadas sobre los procesos de plegamiento del monómero de CTD-Δ177 y su dimerización.

TABLA 13. Conservación e interacciones de los residuos de CTD-Δ177 elegidos para su mutación a alanina.

Residuo	Localización	Interfase	Ca	Interacciones intermoleculares en la interfase ^b		Interacciones intramoleculares en el monómero CTD _{wt} ^c	
				Puentes de Hidrógeno ^d	VdWaals (C-C) ^e	Puentes de Hidrógeno ^d	VdWaals (C-C) ^e
Q155	MHR	primaria	14/14	1 N195	26(7)	1 N195	46(18)
F161	MHR	primaria	10/14		34(25)		40(32)
Y164	MHR	primaria	14/14	1 L190	33(16)	1 L190	38(19)
R154	MHR	secundaria	7/14		5(1)		3(2)
V165	MHR	secundaria	13/14		12(9)		5(5)
F168	MHR	secundaria	14/14		30(26)		33(27)
M185	hélice 9	secundaria	3/14		20(12)		6(4)
L189	hélice 9	secundaria	7/14		7(7)		4(3)
N193	hélice 9	secundaria	7/14	1 I153	9(1)		0
N195	h9-h10	secundaria	7/14	1 G156	17(4)	1 D197, 1 C198	8(1)

^a Conservación en retrovirus; se compararon las secuencias de 14 retrovirus, se indica el número de veces que se repite el residuo o se sustituye por residuos del mismo tipo en cuanto a tamaño o carga.

^b Calculadas con el programa WHAT IF con un criterio de distancia de 1 Å

^c Calculadas con el programa WHAT IF con un criterio de distancia de 1 Å. Sólo se indican las que cada residuo tiene en el monómero y que no están presentes en el dímero

^d Se indican los residuos implicados y el número de puentes de hidrógeno para la cadena lateral (a partir del C_β) de cada residuo mutado.

^e Se indica el número de contactos de Van der Waals y, entre paréntesis, aquellos que implican contactos carbono-carbono con la cadena lateral (a partir del C_β) de cada residuo mutado.

Los residuos de la interfase elegidos para su mutación a alanina se indican en la Tabla 13. De la región MHR se eligieron todos los residuos que estaban más conservados en retrovirus y que intervienen en interacciones entre los monómeros que forman el dímero, mediante contactos hidrofóbicos (R154, F161, V165, F168) y/o mediante interacciones de puente de hidrógeno (Q155, Y164). El único residuo del MHR que participa en contactos intersubunidad en esta interfase y que no se mutagenizó (Y169) presenta una conservación algo menor. Como residuos participantes en la interfase de intercambio de dominios pero no situados en el MHR se eligieron aquellos que participaran en un mayor número de contactos hidrofóbicos (M185, L189) o interacciones de puentes de hidrógeno (N193, N195). De modo estricto, tres de los residuos mutados, todos pertenecientes al MHR (Q155, F161, Y164) pertenecen a la interfase primaria de intercambio de dominios, mientras que los demás (R154, V165, F168 del MHR, y M185, L189, N193 y N195 fuera del MHR) pertenecen a la interfase secundaria (ver Figura 8 y apartado 5 de Introducción). Los residuos M185 y L189 participan tanto en la interfase de dimerización de dominios intercambiados en CTD- Δ 177 como en la interfase formada sin intercambio de dominios que implica principalmente a la hélice 9 en CTD_{wt}. En la Fig. 57 se muestra la interfase de dimerización de dominios intercambiados y se indican las cadenas laterales de los residuos elegidos para su mutación a alanina.

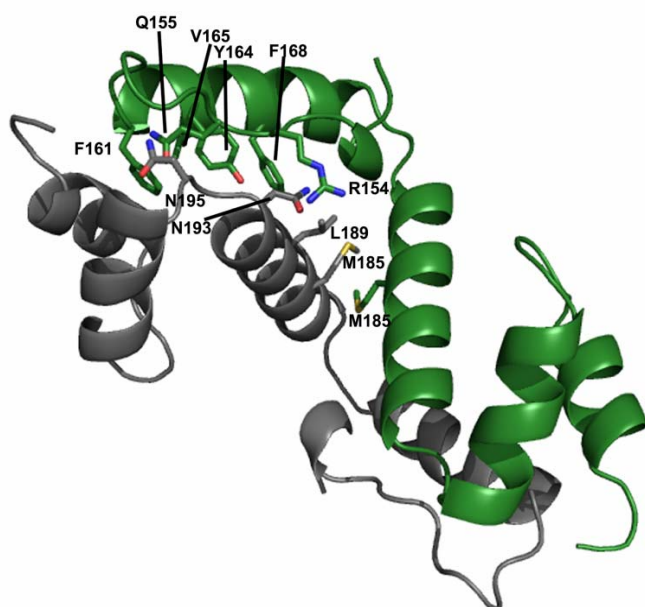


FIGURA 57. Localización en la estructura cristalográfica de CTD- Δ 177 de los residuos de la interfase de dimerización mediante intercambio de dominios elegidos para el análisis mutacional de esta interfase. Se representa un modelo de cintas de CTD- Δ 177, con cada monómero indicado en un color diferente. Se muestran y rotulan las cadenas laterales de los residuos de la interfase de dimerización mediante intercambio de dominios cuyo papel en el plegamiento y la dimerización hemos analizado en este estudio.

Efecto de las mutaciones sobre la expresión y estabilidad de CTD- Δ 177. Los 10 variantes de CTD- Δ 177 con mutaciones puntuales en la interfase de dimerización mediante dominios intercambiados se expresaron como proteínas de fusión con la

proteína GST, del mismo modo que para CTD- Δ 177 parental. En la Fig. 58 se muestran dos geles de electroforesis de las proteínas de fusión entre GST y los diversos mutantes de CTD- Δ 177.

Seis de los mutantes (R154A, V165A, F168A, M185A, L189A y N195A) se expresaron, al igual que CTD- Δ 177 parental, en forma soluble. Estos mutantes se separaron de GST mediante hidrólisis específica con trombina, y pudieron ser purificados para su análisis bioquímico, aunque se obtuvieron en menor cantidad que el CTD- Δ 177 parental. Por el contrario, para los cuatro mutantes restantes (Q155A, F161A, Y164A, N193A) se obtuvieron niveles de producción de proteína recombinante más bajos que para los otros 6 mutantes; además, en estos 4 mutantes se obtuvo mayoritariamente o únicamente proteína GST (Fig. 58a); en algún caso se observó una pequeña proporción de la proteína de fusión GST-CTD- Δ 177. Tras la digestión con trombina en tres de estos cuatro casos, no se observó la aparición de ninguna cantidad de CTD- Δ 177 libre (Fig. 58b), incluso en aquellos casos en que se había podido obtener una pequeña cantidad de la proteína de fusión. Sólo en el caso del mutante N193A se obtuvo una pequeña cantidad del dominio libre tras la digestión con trombina, pero precipitó irreversiblemente. Por tanto, CTD- Δ 177 con cualquiera de estas cuatro mutaciones estaba siendo degradado casi totalmente. Aunque el mutante F168A pudo ser purificado en pequeña cantidad en forma soluble, precipitó poco después de modo irreversible. Estamos intentando obtener de otros modos y solubilizar estos mutantes, que de momento no han podido ser purificados para su análisis.

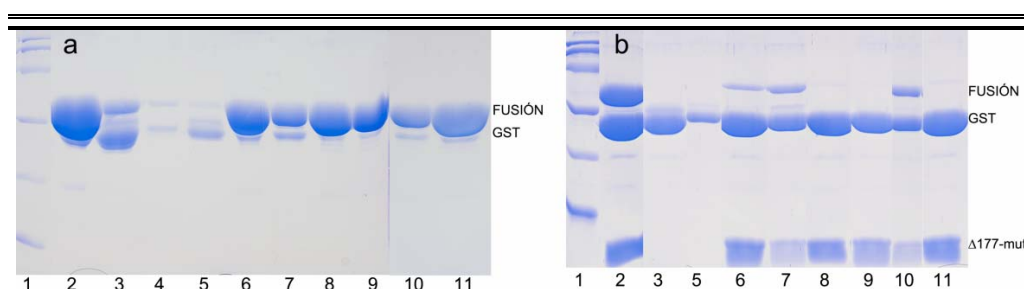


FIGURA 58. SDS-PAGE del proceso de purificación de los mutantes de la interfase de intercambio de dominios. (a) Resultados de SDS-PAGE para diferentes proteínas de fusión GST-CTD-mutante purificadas. (b) Resultados de SDS-PAGE de las mismas proteínas tras ser digeridas con trombina. Para el mutante F161 (calle 4 en el panel (a), ausente en el panel (b)) no se obtuvo apenas proteína de fusión. En cada calle se cargaron 10 μ l de muestra de los mutantes: R154 (calle 2), Q155 (calle 3), F161 (calle 4), Y164 (calle 5), V165 (calle 6), F168 (calle 7), M185 (calle 8), L189 (calle 9), N193 (calle 10) y N195 (calle 11). En ambos geles la calle 1 se cargó con una mezcla de marcadores de peso molecular.

Los defectos encontrados con estos cinco mutantes, tomados en conjunto, indican claramente que las mutaciones Q155A, F161A, Y164A, F168A y N193A desestabilizan seriamente el plegamiento de CTD- Δ 177, conduciendo a la degradación proteolítica parcial o completa de la proteína y a la agregación de la pequeña cantidad de proteína desnaturalizada expresada y no degradada.

Las formas monoméricas de los cinco mutantes de CTD-Δ177 que pudieron obtenerse en forma soluble de modo estable (R154A, F168A, M185A, L189A y N195A) se caracterizaron de modo comparativo con el monómero parental mediante espectroscopía DC en el UV lejano y de fluorescencia (Fig. 59). Los cinco mutantes mostraron un espectro DC correspondiente a una proteína plegada del mismo modo helicoidal que CTD-Δ177 parental (Fig. 59a). En el caso de N195A el espectro, aun manteniendo la misma forma y relación de elipticidades a 208 y 220 nm que el del parental, resultó de menor intensidad, muy probablemente debido a agregación parcial durante la adquisición de datos (ver a continuación).

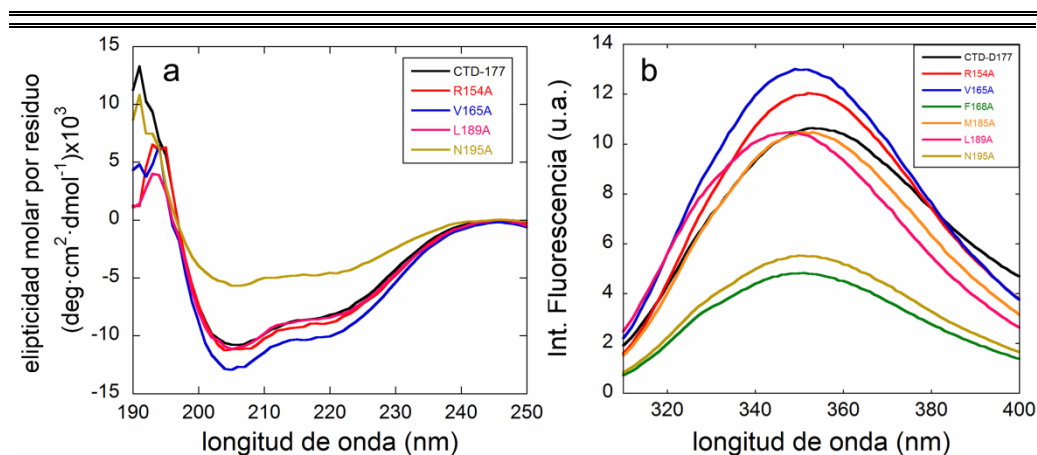


FIGURA 59. Espectros de DC en el UV lejano (a) y de emisión de fluorescencia (b) del monómero de variantes de CTD-Δ177. Los variantes analizados y el color de los trazos correspondientes se indican como insertos en cada panel. La concentración de proteína fue de 20 μM y se encontraba disuelta en 25 mM fosfato sódico pH 7,4. Las demás condiciones utilizadas son las que se describen en la leyenda de las Figuras 46 y 47a.

Los espectros de emisión de fluorescencia de la forma monomérica de los cinco mutantes solubles, y del mutante F168A (que pudo utilizarse en este experimento antes de que agregara) se muestran en la Fig. 59b. Los espectros de R154A, V165A, M185A y L189A mostraron una intensidad similar a la del CTD-Δ177 parental. Al igual que en los experimentos de DC, el mutante N195A presentó un espectro de menor intensidad, y lo mismo ocurrió con el mutante F168A que tiene una fuerte tendencia a agregar. De nuevo, la agregación parcial de estos dos mutantes durante la adquisición de datos constituye la explicación más probable. En cualquier caso, en los seis mutantes, como en CTD-Δ177 parental, el máximo de intensidad de fluorescencia ocurre a una longitud de onda cercana a 350 nm, lo que indica que W184 se encuentra en todos los casos expuesto al solvente de modo similar. Se aprecia un ligero desplazamiento del máximo de fluorescencia hacia valores menores de longitud de onda en V165A y especialmente, L189A, lo que puede deberse a pequeñas diferencias en el plegamiento del monómero, y por tanto, en la exposición al solvente del W184 (Tabla 14).

TABLA 14. Longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia, y relación entre los mínimos de elipticidad para diferentes variantes de CTD-Δ177.

Proteína	Máximo Emisión Fluorescencia (nm)	Relación $\Theta_{208nm}/\Theta_{222nm}^a$
CTD-Δ177	353	1,33
CTD-Δ177/R154	352	1,33
CTD-Δ177/V165	350	1,28
CTD-Δ177/F168	340	ND
CTD-Δ177/M185	352	1,29
CTD-Δ177/L189	347	1,31
CTD-Δ177/N195	351	1,33

^a Θ , elipticidad molar.

Para realizar un estudio comparativo de la estabilidad conformacional de la forma monomérica de los 5 mutantes de CTD-Δ177 que sí consiguieron plegarse y mantenerse en forma soluble, se realizaron experimentos de desnaturalización térmica seguida mediante espectroscopía DC, utilizando CTD-Δ177 parental como referencia (ver apartado 11 de Materiales y Métodos y apartado 5.1 de Resultados). El valor de elipticidad a 222 nm se representó frente a la temperatura, y los datos se ajustaron a una transición unimolecular monómero nativo-monómero desnaturalizado (Fig. 60). Los parámetros termodinámicos se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones 18 y 19 (Tabla 15).

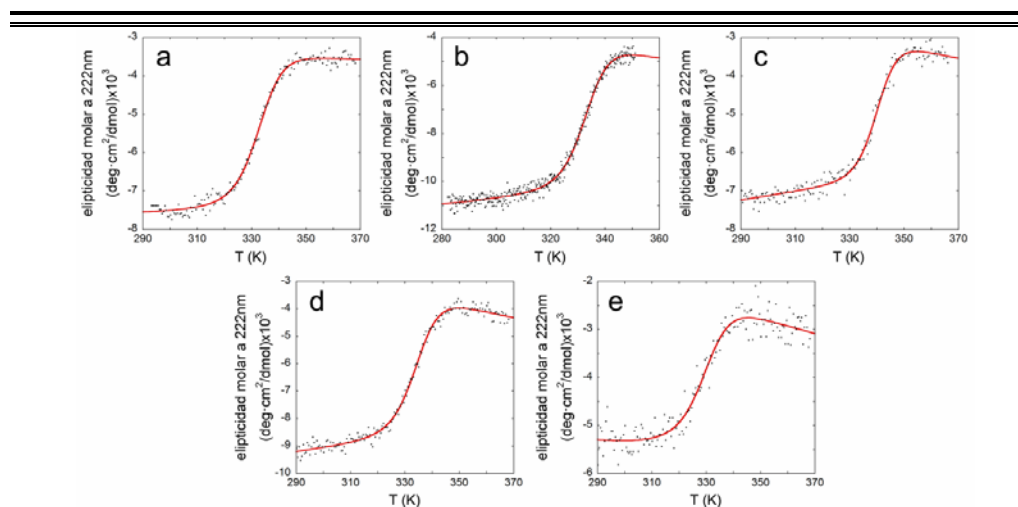
**FIGURA 60.** Análisis de la estabilidad del monómero de variantes de CTD-Δ177 frente a su desnaturalización térmica. La desnaturalización de los cinco variantes estables de CTD-Δ177 con mutaciones individuales a alanina se siguió a través de la variación de la elipticidad a 222 nm en función de la temperatura. (a) CTD-Δ177/R154A; (b) CTD-Δ177/V165A; (c) CTD-Δ177/M185A; (d) CTD-Δ177/L189A; (e) CTD-Δ177/N195A. Se utilizó CTD-Δ177 parental como control (ver Fig. 49). La proteína se encontraba a una concentración de 20 μM en 25 mM fosfato sódico pH 7,4. Los datos experimentales se ajustaron a las Ecs. 18 y 19 (trazos continuos), obteniéndose los valores de los parámetros termodinámicos indicados en la Tabla 15

TABLA 15. Parámetros termodinámicos obtenidos para la desnaturalización térmica de CTD-Δ177 y sus variantes^a.

	T_m (°C) ^b	$\Delta H_u^{T_m}$ (kcal/mol) ^c
CTD _{wt}	63,10 ± 0,04	45,0 ± 0,4
CTD-Δ177	62,7 ± 0,2	38 ± 2
CTD-Δ177/R154A	59,2 ± 0,1	49 ± 3
CTD-Δ177/V165A	59,6 ± 0,1	50 ± 3
CTD-Δ177/M185A	67,1 ± 0,1	61 ± 4
CTD-Δ177/L189A	61,1 ± 0,1	51 ± 3
CTD-Δ177/N195A	56,0 ± 0,2	44 ± 7

^a La concentración de todos los mutantes fue de 20 μM (monómero).

^b T_m , temperatura de transición.

^c $\Delta H_u^{T_m}$, variación en la entalpía de desnaturalización a la temperatura de transición.

Los errores que se indican son errores de ajuste.

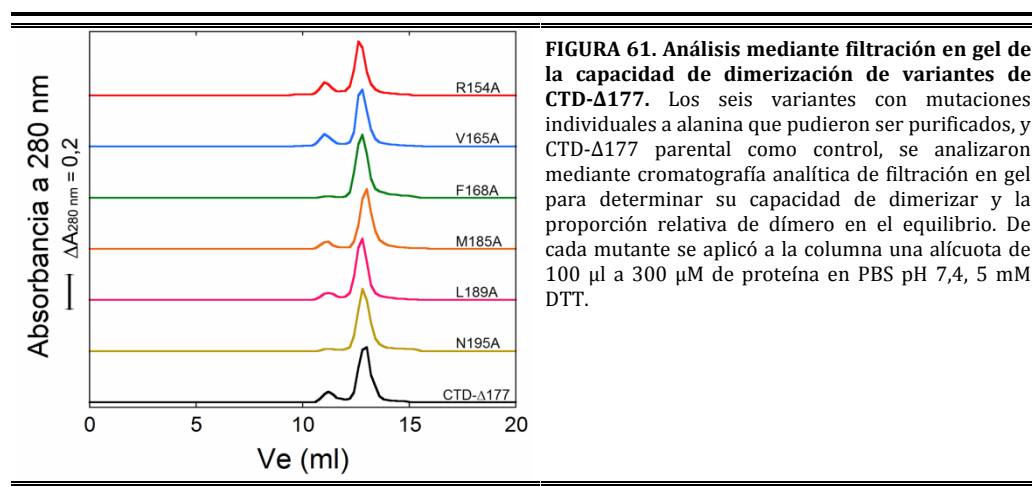
Los valores obtenidos para la T_m demuestran que la mayoría de las mutaciones producen la desestabilización del monómero de CTD-Δ177. Tres mutaciones desestabilizan significativamente el monómero (entre 3 °C y 7 °C): N195A (fuera del MHR) y V165A y R154A (en el MHR). La mutación L189A (fuera del MHR) apenas desestabiliza el monómero (en 1,5 °C), y la mutación M185A (localizada en la región bisagra, fuera del MHR) estabiliza significativamente el monómero (en 4,4 °C).

En resumen, de las 10 mutaciones analizadas en la interfase de intercambio de dominios en CTD-Δ177, seis de ellas pertenecientes a la región altamente conservada MHR, cinco impiden el plegamiento del monómero de CTD, tres desestabilizan significativamente el monómero de CTD, y únicamente dos mutaciones, que no se localizan en el MHR, no ejercen un efecto desfavorable sobre la estabilidad del monómero.

Efecto de las mutaciones sobre la capacidad de dimerización de CTD-Δ177.

Los 6 variantes que pudieron obtenerse en forma soluble (R154A, V165A, F168A, M185A, L189A y N195A) se concentraron hasta 300 μM, una vez purificados, y se les dejó alcanzar el equilibrio termodinámico en tampón PBS pH 7,4, 5 mM DTT durante varias semanas. Tras ese periodo de tiempo se sometió una alícuota de 100 μl de cada uno a cromatografía analítica de filtración en gel para determinar las proporciones de dímero y monómero presentes, como se indica en el apartado 9 de Materiales y Métodos (Fig. 61). De estos seis mutantes, sólo R154A y V165A, que pertenecen al MHR, formaron dímeros en proporciones similares (alrededor del 20%) a la obtenida para CTD-Δ177 parental en las mismas condiciones. Los mutantes M185A y L189A, que no pertenecen al MHR, formaron dímeros en una proporción significativamente menor (en torno al 10%). Los

mutantes que presentaron menor estabilidad, F168A (perteneciente al MHR) y N195A (no perteneciente al MHR) formaron dímero en una proporción prácticamente inapreciable (en torno a un 3% o menor).



En la Tabla 16 se resumen las características que se han determinado para los mutantes de CTD-Δ177. Se observa una relación directa entre pertenencia de un residuo a la región MHR y un papel en la estabilidad del monómero de CTD: la mutación de residuos del MHR condujo sin excepción a una menor estabilidad térmica (R154A, V168A), asociada con una elevada tendencia a la agregación (F168A) o incluso a un problema de plegamiento que condujo a la agregación y/o degradación proteolítica de la proteína (Q155A, F161A, Y164A). Por el contrario, no se observa una relación entre pertenencia de un residuo al MHR y un papel en la dimerización de CTD mediante intercambio de dominios: dos de las tres mutaciones en el MHR para las que se pudo analizar la capacidad de dimerización de modo no totalmente acoplado al plegamiento del monómero (R154A y V165A), rindieron proporciones de dímero equivalentes a las obtenidas para CTD parental; la tercera mutación (F168A) redujo la capacidad de dimerización, pero esta reducción vino asociada a un problema de plegamiento. En cambio, las tres mutaciones en la interfase no pertenecientes al MHR que se pudieron ensayar (M185A, L189A y N195A) redujeron claramente la capacidad de dimerización, a pesar de que las dos primeras no desestabilizaron el monómero. En resumen, utilizando CTD-Δ177 en solución como modelo, no se observó una correlación entre pertenencia de un residuo al MHR y un papel en la dimerización de CTD mediante intercambio de dominios; sí se observó una correlación entre pertenencia de un residuo al MHR y un papel en la estabilidad conformacional del monómero de CTD.

TABLA 16. Resumen de las características obtenidas para los variantes de CTD- Δ 177 con mutaciones en la interfase de dimerización.

Mutante	Interfase	Localización	Estabilidad conformacional		Dimerización K_{dis} (mM) ^b
			Plegamiento	ΔT_m (°C) ^a	
Q155A	primaria	MHR	desplegado	ND ^c	ND ^c
F161A	primaria	MHR	desplegado	ND ^c	ND ^c
Y164A	primaria	MHR	desplegado	ND ^c	ND ^c
R154A	secundaria	MHR	plegado	-3,5	1,07
V165A	secundaria	MHR	plegado	-3,1	1,21
F168A	secundaria	MHR	agrega	ND ^c	10,9
M185A	secundaria	hélice9	plegado	+4,4	2,32
L189A	secundaria	hélice 9	plegado	-1,5	2,16
N193A	secundaria	hélice 9	agrega	ND ^c	ND ^c
N195A	secundaria	h9-h10	plegado	-6,7	6,9

^a ΔT_m , diferencia en la temperatura de desnaturalización entre el mutante y el CTD- Δ 177 parental.

^b K_{dis} , constante de equilibrio de disociación, calculada mediante cromatografía analítica de filtración en gel. Para CTD- Δ 177 K_{dis} fue de 1,3 mM.

^c ND, no determinado

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. La hexamerización de CA depende críticamente de un reordenamiento conformacional que ocurre durante la homodimerización de su dominio C-terminal

Los estudios biofísicos y bioquímicos previos de nuestro laboratorio sobre el ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 se habían centrado sobre todo en la interfase de homodimerización de CTD, que conecta los hexámeros de CA con cada uno de sus vecinos. Tanto desde el punto de vista de la caracterización molecular y energética de interfases entre subunidades de cápsidas víricas, que venimos realizando en el laboratorio, como para el diseño racional de inhibidores del ensamblaje de la cápsida de VIH-1, que abordamos en este trabajo, nos interesaba iniciar además un estudio de los determinantes moleculares necesarios para la formación de hexámeros de CA.

Para este tipo de estudios, era necesario en primer lugar averiguar qué requisitos permiten la formación de hexámeros de NTD o de CA en solución. Otros autores han mencionado (a partir de resultados no mostrados) que no habían sido capaces de detectar en solución ni el hexámero de NTD ni el de CA completa (con la interfase CTD-CTD inactivada mediante mutación, para evitar su polimerización en cápsidas). La utilización de condiciones apropiadas permitieron la cristalización del hexámero de NTD de MLV, pero no de VIH-1. Muy recientemente, mientras este trabajo se estaba desarrollando, se ha resuelto la estructura cristalográfica del hexámero de CA de VIH-1, pero la hexamerización sólo pudo conseguirse en condiciones de cristalización y mediante dos estrategias que favorecieron artificialmente el proceso (Pornillos, *et al.*, 2009). La primera estrategia consistió en la introducción de cisteínas en CA que permitieron la formación de puentes disulfuro entre subunidades, los cuales estabilizaron el hexámero en condiciones oxidantes al impedir la completa disociación de las subunidades. La segunda estrategia consistió en expresar CA como producto de fusión con la proteína CcmK4 de *Synechocystis* sp. PCC 6803, que forma anillos hexaméricos estables en solución con alta afinidad; la hexamerización de CcmK4 permitió aumentar la concentración local de CA y facilitó su cristalización en forma de hexámeros.

En nuestro laboratorio nos habíamos preguntado con anterioridad por qué CA de VIH-1 era incapaz de polimerizar en partículas semejantes a cápsidas maduras en condiciones de fuerza iónica fisiológica, incluso cuando se utilizaban las máximas concentraciones de CA alcanzables, de alrededor de 1 mM. La concentración de CA en el virión es de 3,5 mM de CA como mínimo (Briggs, *et al.*, 2003) y podría alcanzar 8 mM si se acepta una estimación de cerca de 5000 moléculas de CA por virión (Briggs, *et al.*, 2004). Además, estos valores no tienen en cuenta que el interior del virión es un medio fuertemente aglomerado, por lo que la actividad química de CA en el virión será bastante más elevada. Nuestros estudios demostraron entonces que para permitir la

polimerización eficaz de CA *in vitro* en partículas con la organización de la cápsida madura a fuerza iónica fisiológica bastaba con incrementar su actividad química mediante la adición de un agente de aglomeración molecular inerte, acercando la actividad química de CA a la que presenta en el virión (del Alamo et al., 2005; Mateu 2009).

En base a estos resultados, razonamos que la utilización de las mismas condiciones de ensayo, incluyendo la presencia de un agente aglomerante, permitirían la hexamerización de NTD, o al menos la de CA (con la interfase de dimerización inactivada para evitar la polimerización de los hexámeros formados). De tener éxito, este estudio demostraría la necesidad y suficiencia de una actividad química elevada para la hexamerización de CA, como lo habíamos demostrado para la polimerización de CA en cápsidas, y permitiría además obtener hexámeros nativos en solución y sin introducir ninguna modificación artificial.

Puesto que los resultados que indicaban la no hexamerización de NTD o CA de VIH-1 en solución y las condiciones en que se realizaron esos experimentos no se han publicado (únicamente mencionado en artículos), decidimos en primer lugar ensayar diferentes condiciones (sin añadir de momento un agente aglomerante) para comprobar este punto, y determinamos el estado de oligomerización de NTD o de CA completa (con las mutaciones W184A y M185A que inactivan por completo la interfase de dimerización). De este modo confirmamos que ni NTD ni CA presentan tendencia significativa alguna a oligomerizar en las condiciones ensayadas, incluso a fuerza iónica muy elevada y a concentraciones de proteína tan elevadas como 1 mM.

A continuación se intentó la formación de hexámeros de NTD o de CA en las mismas condiciones, pero añadiendo además un agente de aglomeración molecular para elevar su actividad química. En contra de lo que en principio esperábamos, tampoco se encontró ninguna tendencia significativa ni de NTD ni de CA (con la interfase de dimerización inactivada) a formar oligómeros.

La ausencia de hexamerización de NTD incluso en presencia de un agente aglomerante resulta en principio fácilmente explicable. Basta con proponer que además de las interfases principales de hexamerización, NTD-NTD, las interfases adicionales NTD-CTD en los hexámeros son también energéticamente críticas. Estudios mutacionales recientes realizados *ex vivo* sugieren que este es, en efecto, el caso (revisiones en (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2008; Mateu, 2009)); ver también (Noviello, *et al.*, 2011).

Sin embargo, la ausencia de hexamerización de CA completa (con la interfase de dimerización inactivada) resulta más difícil de explicar. Es importante resaltar que los ensayos finales para determinar si CA (con la interfase de dimerización inactivada) era capaz de hexamerizar en presencia de agente aglomerante se realizaron exactamente en las mismas condiciones en que CA (sin mutaciones) era capaz de polimerizar muy eficazmente en partículas semejantes a cápsidas maduras. Los experimentos de hexamerización y polimerización se realizaron en paralelo, y las únicas diferencias fueron la presencia o no en CA de mutaciones que inactivaban la interfase de dimerización, y el

método de análisis seguido (ultracentrifugación analítica para la hexamerización, turbidimetría para la polimerización). Incluso cuando la concentración de CA mutada fue mayor que la de CA no mutada, la primera no reveló tendencia alguna a la hexamerización, mientras la segunda polimerizó eficazmente; esta polimerización en partículas con la organización de la cápsida madura implica necesariamente la hexamerización de CA.

Por tanto, un razonamiento lógico nos lleva a proponer que la inactivación de la interfase CTD-CTD mediante las mutaciones introducidas, W184A y M185A, es la causa de la incapacidad de CA para hexamerizar en condiciones de suficiente actividad química que de otro modo permitirían esta reacción. Para que tenga lugar la hexamerización de CA, debe haberse producido primero su dimerización a través de la interfase CTD-CTD. Al producirse esta dimerización de CA ocurriría un cambio conformacional en CTD que genera la adecuada conformación en la región de CTD que interaccionará con NTD para formar las interfases NTD-CTD que participan en la formación del hexámero.

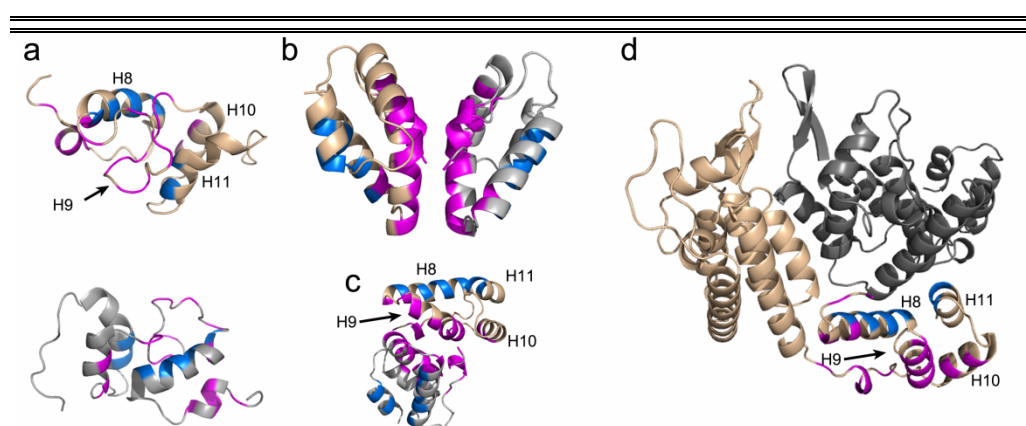


FIGURA 62. Estructura comparada del monómero de CTD en diferentes entornos estructurales. (a) Diagrama de cintas de la estructura en solución del monómero de CTD (mutante W184A) obtenida mediante espectroscopía RMN (Alcaraz, *et al.*, 2007). Arriba y abajo se muestran dos orientaciones diferentes. Se indican los residuos que forman parte de la interfase CTD-CTD (fucsia) y los que forman parte de la interfase CTD-NTD (azul). (b) Diagrama de cintas de la estructura cristalográfica del homodímero de CTD (Worthylake, *et al.*, 1999). Los residuos que forman parte de las interfases CTD-CTD y CTD-NTD se indican con el mismo código de colores que en (a). (c) Se muestra la misma estructura que en (b), pero girada para mostrar un monómero de CTD en la misma orientación que aparece en (d). (d) Diagrama de cintas de dos moléculas de CA contiguas en la estructura cristalográfica del hexámero de CA (Pornillos, *et al.*, 2009). En el dominio CTD de una de estas moléculas de CA (parte inferior de la imagen), los residuos que forman parte de las interfases CTD-CTD y CTD-NTD se indican con el mismo código de colores que en (a). La comparación de estas estructuras permite observar que el epítipo en el dímero de CTD (b, c) que forma la interfase de unión con NTD (d) no está formado en el monómero aislado (a).

Estudios previos de diversos grupos, incluidos el nuestro y el del Prof. J.L. Neira, han permitido obtener evidencia estructural que apoya la hipótesis que acabamos de formular. Nuestros estudios biofísicos demostraron que durante la dimerización de CTD se produce efectivamente un rearrreglo conformacional de la estructura de cada

monómero; la caracterización biofísica del monómero de CTD sin mutaciones indica que su conformación es muy parecida o igual a la del monómero de CTD con la interfase de dimerización inactivada por la mutación W184A (CTD-W184A) (Mateu, 2002); recientemente, el Prof. J.L. Neira en colaboración con nosotros ha determinado la estructura de CTD-W184A mediante espectroscopía RMN. La estructura del monómero de CTD libre es, en efecto, diferente de la de cada monómero como parte del dímero de CTD (Alcaraz, *et al.*, 2007). El monómero libre, a diferencia de cada subunidad en el dímero, presenta la hélice 9 transitoriamente desestructurada, y las dos últimas hélices (10 y 11) están orientadas en una posición perpendicular a la que adoptan en la forma dimérica de CTD (Fig. 62a); precisamente son estas hélices 10 y 11 las que forman una parte muy importante de la región de CTD que interacciona con el NTD de la subunidad vecina en el hexámero de CA.

En resumen, el proceso de ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 requiere en primer lugar la dimerización de CA (que ocurre fácilmente incluso en solución diluida y fuerza iónica fisiológica). La dimerización de CA no sólo estructura de modo permanente la hélice 9 que participa en las interfases CTD-CTD, sino que también reorganiza la posición de las hélices 10 y 11, que se orientan en la posición correcta para generar la región de interacción de CTD con NTD de otra subunidad, permitiendo la formación de las interfases NTD-CTD. Estas, junto con las interfases NTD-NTD, permiten el ensamblaje de cada hexámero (Fig. 62b) y la formación de la cápsida madura de VIH-1.

2. La acción de inhibidores del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 se reduce en condiciones de aglomeración macromolecular similares a las fisiológicas

En los últimos años se vienen realizando diversos estudios que demuestran las diversas e importantes consecuencias de la aglomeración macromolecular en el entorno fisiológico sobre diversas reacciones bioquímicas. Una de las predicciones de la teoría de aglomeración molecular es que en un entorno aglomerado la capacidad inhibitoria de moléculas relativamente pequeñas sobre reacciones de asociación macromolecular se vería reducida. En nuestro laboratorio hemos evaluado experimentalmente esta predicción teórica utilizado en paralelo dos sistemas modelo de sumo interés en virología: el reconocimiento virus-receptor celular y el ensamblaje de cápsidas víricas. Para ello utilizamos dos sistemas modelo. El primer modelo contempla la inhibición por péptidos pequeños de la reacción de asociación macromolecular entre el virus de la fiebre aftosa y sus receptores sobre la membrana de células susceptibles a la infección por este virus, y ha sido explorado por la Lda. V. Rincón como parte de su Tesis doctoral. El segundo modelo contempla la inhibición por péptidos del ensamblaje *in vitro* de la

cápsida madura de VIH-1, y ha sido explorado por nosotros en el presente estudio (apartado 2 de Resultados).

El modelo que hemos usado para estudiar la inhibición del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 implica esencialmente los siguientes factores: i) un ensamblado macromolecular de gran tamaño (T) (la cápsida en formación); ii) la competición entre un inhibidor (I) de tamaño relativamente pequeño (el péptido CAI o el dominio CTD, peso molecular entre 10^3 y 10^4 Da), y las macromoléculas o agregados de macromoléculas (M) (los dímeros CA-CA y oligómeros de CA de tamaño variado que constituyen los elementos a partir de la cual se ensambla la cápsida mediante un proceso de acreción); iii) la presencia o ausencia de una macromolécula inerte como agente de aglomeración molecular (C). La presencia de C a concentraciones elevadas nos permitió alcanzar condiciones de aglomeración molecular *in vitro* que se acercan a las presentes en el virión de VIH-1 (donde tiene lugar el ensamblaje de la cápsida madura), así como en otros fluidos biológicos intra- o extra-celulares.

Se eligió Ficoll-70 como agente de aglomeración molecular debido a su baja viscosidad, su tamaño comparable al de muchas proteínas, y su baja tendencia a interactuar con otros solutos (como proteínas) de manera inespecífica (Fodeke y Minton, 2010). Las concentraciones de Ficoll-70 que se han usado en este estudio promueven *in vitro* el entorno aglomerado que *in vivo* está originado por una mezcla heterogénea de proteínas. Para comprobar que nuestros resultados eran válidos en presencia de cualquier agente de aglomeración molecular se utilizó además Dextrano-T40, también ampliamente usado en este tipo de estudios. El Dextrano se utilizó a menor concentración porque su efecto de exclusión de volumen es mayor que el del Ficoll, debido a su diferente geometría (las moléculas de Ficoll son aproximadamente esféricas, mientras que las de Dextrano son esferocilíndricas, considerablemente alargadas) (Homouz, *et al.*, 2009). El uso de un único agente de aglomeración molecular en los experimentos evita las complicaciones debidas a efectos adicionales que podrían darse si se utilizaran mezclas complejas de macromoléculas (Ando y Skolnick, 2010).

La conclusión principal a la que llegamos a partir de los resultados obtenidos es que la aglomeración molecular puede reducir los efectos de inhibidores de pequeño tamaño. La teoría del volumen de exclusión proporciona un marco conceptual simplificado y una explicación termodinámica general para esta observación: Si el tamaño de I (inhibidor) y M (macromolécula con la que compite) son similares, entonces la actividad inhibitoria de I será similar en solución diluida (no fisiológica) y en un entorno aglomerado; sin embargo, si el tamaño de I es claramente inferior al de M (como es el caso en nuestro sistema de inhibición de ensamblaje de la cápsida de VIH-1), la actividad de I se verá claramente reducida en condiciones de aglomeración molecular, como justificó teóricamente Minton (ejemplo I en (Minton, 1993) del modo que se resume a continuación:

Si M (macromolécula, en nuestro caso una subunidad que va a agregarse a la cápsida en formación) se une a T (macromolécula diana, en nuestro caso la cápsida en

crecimiento) con una constante aparente de asociación en el equilibrio K_{MT} , y si I (inhibidor pequeño, por ejemplo el péptido CAI) se une a T con una constante aparente de asociación en el equilibrio K_{IT} , las relaciones entre K_{MT} o K_{IT} y las correspondientes constantes verdaderas de equilibrio de asociación son:

$$K_{MT} = K_{MT}^0 \gamma_M,$$

$$K_{IT} = K_{IT}^0 \gamma_I,$$

donde γ_M y γ_I son los coeficientes de actividad químicos de M e I, respectivamente. Entonces, la relación entre la preferencia (P) de T por M respecto a I será:

$$\frac{K_{MT}}{K_{IT}} = \frac{(K_{MT}^0 \gamma_M)}{(K_{IT}^0 \gamma_I)} = P_0 \left(\frac{\gamma_M}{\gamma_I} \right),$$

donde P_0 es la preferencia de T por M sobre I, en una solución ideal (diluida), en la cual $\gamma_M = \gamma_I = 1$. Cuando está presente una elevada concentración de una especie inerte C actuando como agente de aglomeración molecular (en nuestro modelo, Ficoll o dextrano), el valor del coeficiente de actividad γ_x dependerá, en parte, del tamaño del reactivo X respecto al tamaño de C. (Recordemos que el Ficoll es mayor que los inhibidores I utilizados en nuestro estudio). Además, si I es menor que M (como es el caso que nos ocupa), γ_M aumentará más deprisa que γ_I con la concentración de C, porque el volumen disponible en esas condiciones es menor para M que para I. Entonces, $\gamma_M/\gamma_I > 1$, y $P > P_0$, es decir, en un entorno aglomerado será mayor la preferencia por M que por I.

Si todo lo anterior aplica a nuestro modelo en las condiciones que hemos utilizado experimentalmente, sería de esperar que en presencia de agentes de aglomeración molecular aumente la preferencia de unión de las subunidades que forman la cápsida por acreción (dímeros y oligómeros de CA) frente a la unión de los inhibidores (más pequeños) CTD o el péptido CAI. Por tanto, sería de esperar que esto hiciera que la capacidad inhibitoria de estos compuestos relativamente pequeños se viera reducida, como hemos observado experimentalmente en este estudio.

Está claro que el uso de un único agente de aglomeración macromolecular constituye una aproximación inicial para estudiar ciertos efectos de elevadas concentraciones de macromoléculas. Los medios biológicos son aglomerados pero también heterogéneos, de modo que la exclusión de volumen no será el único factor que afecte a las reacciones bioquímicas en estas condiciones. Por tanto, además de los efectos observados debido a la exclusión de volumen, *in vivo* podrán encontrarse otros efectos derivados de la presencia de mezclas complejas de macromoléculas.

Muy recientemente se ha demostrado que pequeños ligandos que se unen a complejos G de DNA en cuádruple hélice y que de este modo inhiben la actividad telomerasa son menos efectivos en condiciones de aglomeración macromolecular (Chen, *et al.*, 2009). Junto con esta observación, nuestros resultados constituyen, en nuestro conocimiento, la primera evidencia experimental de un efecto atenuador de la

aglomeración macromolecular presente en condiciones fisiológicas sobre la actividad inhibitoria de pequeños compuestos en cualquier sistema celular o viral.

Además del avance conceptual, los resultados obtenidos pueden tener implicaciones prácticas en la búsqueda inicial de moléculas pequeñas dirigidas a inhibir el ensamblaje de virus (u otras interacciones macromoleculares). La actividad inhibitoria de los candidatos *in vivo* puede ser menor que la esperada basándose en evaluaciones iniciales llevadas a cabo en solución diluida *in vitro* o en cultivos de células *ex vivo*. Por ejemplo, en los experimentos típicos de ensamblaje de la cápsida de VIH-1, la concentración total de proteína es de sólo unos cuantos mg/ml como máximo, lo que corresponde esencialmente a condiciones diluidas. Estas concentraciones son aproximadamente dos órdenes de magnitud inferiores a las que producen los efectos asociados a un entorno aglomerado *in vivo*. La adición de una elevada concentración de algún agente de aglomeración molecular en los ensayos *in vitro* o *ex vivo* de compuestos con actividad antiviral potencial puede contribuir a una mejor determinación inicial de su posible actividad en condiciones de concentración macromolecular más similares a las que encontrarán *in vivo* en posteriores ensayos. Esta aproximación podría contribuir a una selección más adecuada de la necesariamente limitada serie de compuestos candidatos para subsiguientes ensayos más complejos y costosos realizados *in vivo*.

3. Péptidos interfásicos diseñados de modo racional actúan *in vitro* como inhibidores del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1, y presentan actividad antiviral

3.1. El péptido CAC1 como un inhibidor eficaz del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1

Puede parecer sorprendente que péptidos desestructurados como CAC1 y sus derivados, que representan únicamente una parte de la interfase de dimerización de CTD, sean capaces de unirse a CTD y de inhibir el ensamblaje de partículas semejantes a cápsidas maduras de VIH-1 de modo casi tan eficaz como el dominio CTD completo y plegado. Parte de la explicación puede estar relacionada con las características inusuales de la interfase CTD-CTD. Esta interfase se parece a una típica interfase de alta afinidad en lo referente a área superficial enterrada, número de residuos participantes, presencia de un núcleo hidrofóbico (Gamble, *et al.*, 1997; Worthylake, *et al.*, 1999), y en que contiene nada menos que 9 residuos por monómero que individualmente contribuyen más de 6 kcal/mol a la reacción de dimerización (del Alamo, *et al.*, 2003). Sin embargo, y de modo diferente a otras interfases de oligomerización estructuralmente similares (Bogan y Thorn, 1998), la interfase CTD-CTD presenta una afinidad notablemente baja.

Restricciones estéricas impuestas por la geometría de la organización estructural de la cápsida (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2007) pueden contribuir a la inestabilidad de la cápsida por medio de la distorsión de la conformación no restringida, de mínima energía, de la interfase de dimerización tal como está presente en el dímero aislado de CTD en solución. Sin embargo, incluso en esta forma no restringida de CTD, la dimerización es una reacción de baja afinidad (Gamble, *et al.*, 1997). Esta intrínsecamente baja afinidad puede deberse a: i) la presencia de residuos interfásicos que están implicados en repulsiones coulombianas y otras interacciones desfavorables entre monómeros de CTD (del Alamo, *et al.*, 2003; del Alamo y Mateu, 2005); y ii) la muy baja estabilidad termodinámica de la forma monomérica de CTD (Mateu, 2002), que puede ser la causa subyacente de la elevada plasticidad estructural de este dominio en solución (Alcaraz, *et al.*, 2007; Ivanov, *et al.*, 2007; Wong, *et al.*, 2008), en la unión de ligandos (Sticht, *et al.*, 2005; Ternois, *et al.*, 2005; Mascarenhas y Musier-Forsyth, 2009) y durante el ensamblaje de las cápsidas inmadura y madura (Gross, *et al.*, 1997; Ganser-Pornillos, *et al.*, 2008; Mateu, 2009). Específicamente, en el monómero de CTD la hélice 9 parece encontrarse sólo parcial o transitoriamente estructurada (Alcaraz, *et al.*, 2007; Wong, *et al.*, 2008), y debe estructurarse durante la dimerización. Por tanto, el éxito del péptido CAC1 y sus derivados, miméticos de la hélice 9, como inhibidores interfásicos del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 puede ser principalmente debido al hecho de que el elevado costo entrópico que debe pagarse en la asociación CAC1-CTD es similar al que debe pagarse en la asociación CTD-CTD: ni el péptido CAC1 ni la hélice 9 están completamente estructurados antes de que ocurra la dimerización (Alcaraz, *et al.*, 2007).

Incluso si se tienen en cuenta estos efectos entrópicos, permanece el hecho de que CAC1 incluye la mayoría pero no todos los residuos de CTD energéticamente importantes para la dimerización CTD-CTD (del Alamo, *et al.*, 2003). Por tanto, si CAC1 unido a CTD mimetizara de forma enteramente fiel la conformación de la hélice 9 como parte de CTD, se podría esperar una diferencia de afinidad mayor que la experimentalmente obtenida. Sin embargo, el mapeo del sitio de unión de CAC1 en CTD reveló un solapamiento sustancial, pero lejos de completo, con el epítipo de dimerización CTD-CTD. Además, otros residuos localizados cerca, pero no en la interfase de dimerización afectaron a la unión de CAC1.

Una interpretación detallada de las diferencias estructurales y energéticas observadas entre la interfase de dimerización de CTD y la interfase CTD-CAC1 debe esperar la determinación de la estructura de este último complejo. Mientras tanto, proponemos tentativamente que CAC1, a pesar de contener la hélice 9 completa, puede adoptar al unirse a CTD una conformación plegada que se parece a, pero no mimetiza completamente la de la hélice 9 en el dímero de CTD, pero establece suficientes contactos adicionales con CTD como para permitir una unión relativamente fuerte. A pesar de las diferencias en la unión y la conformación, el solapamiento sería suficiente para impedir estéricamente la dimerización de CTD y la polimerización de CA.

3.2. Péptidos derivados de CAC1

Nuestro diseño racional para incrementar la solubilidad de CAC1 y su afinidad por CTD condujo en dos etapas al péptido CAC1M, que con respecto a CAC1 incluye múltiples sustituciones de aminoácido y unas cortas extensiones N- y C-terminales. Estas modificaciones se realizaron para romper una secuencia con probable tendencia a agregar, incrementar la solubilidad, incrementar la propensión helicoidal y/o eliminar cadenas laterales que, al menos en el dominio CTD completo, restringían la afinidad de dimerización. El diseño fue moderadamente exitoso. En particular, las sustituciones S178A y Q192A pueden haber contribuido a un incremento en la afinidad y la actividad inhibitoria del péptido sobre el ensamblaje como se pretendía. Sin embargo, el incremento de afinidad fue menor que el conseguido cuando se realizaron las mismas sustituciones sobre el CTD (del Alamo, *et al.*, 2003). De nuevo, esta diferencia podría explicarse por el hecho de que, al unirse a CTD, CAC1 y sus derivados no reproducen enteramente la conformación de la hélice 9 en el dominio.

3.3. Péptido H8

Un nuevo péptido derivado de CA, H8, que diseñamos siguiendo el mismo razonamiento que para CAC1, también se ha demostrado capaz de inhibir el ensamblaje de CA y la inhibición de VIH-1, lo que demuestra la validez de este razonamiento para el diseño de inhibidores interfásicos de naturaleza peptídica. Aunque aún no se ha determinado el epítipo de unión de H8 a CA, por comparación con CAC1, es razonable pensar que H8, que representa la secuencia de la hélice 8 de CTD (la cual participa en la interfase CTD-NTD), se pueda unir a NTD e inhibir de forma competitiva la heterodimerización CTD-NTD durante el ensamblaje de la cápsida madura. H8 no resultó tan buen inhibidor del ensamblaje como CAC1. Esto podría deberse a que la hélice 8, a diferencia de la hélice 9, sí que está estructurada en el monómero de CTD, mientras que H8 en solución (como CAC1 y la mayoría de péptidos lineales cortos) no está estructurado. Por lo tanto, la afinidad entre H8 y CA será menor que la afinidad entre CTD y NTD, en parte a causa del coste entrópico generado por la necesaria estructuración del péptido H8 durante el proceso de unión a NTD, y que no existe al unirse la hélice 8 en CTD, ya estructurada, al NTD.

3.4. Mezclas de péptidos inhibidores

Los péptidos diseñados mediante la aproximación racional descrita (CAC1, su derivado mejorado CAC1M y H8) se añaden al péptido CAI identificado a partir de una biblioteca combinatorial al azar, y a su derivado mejorado NYAD-1 (Zhang, *et al.*, 2008) como inhibidores peptídicos del ensamblaje de la cápsida madura de VIH-1 *in vitro* y de la infectividad de VIH-1 *ex vivo*. CAC1, CAC1M y H8 aportan una prueba de principio de que

es posible el diseño racional de inhibidores interfásicos basados en la mimetización parcial de hélices de reconocimiento entre las subunidades de una cápsida vírica como la de VIH-1. Expanden así el tipo de aproximaciones y la capacidad de elegir diferentes cabezas de serie para el diseño de peptidomiméticos y otras moléculas pequeñas como potenciales inhibidores del ensamblaje de VIH-1. Pero además, el disponer de varios péptidos inhibidores dirigidos a diferentes interfases de ensamblaje, nos permitió analizar la capacidad inhibitoria de mezclas de estos péptidos sobre el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1.

Los experimentos revelaron una interferencia negativa entre H8 y CAI, un efecto aditivo entre CAC1M y H8, y un efecto sinérgico entre CAI y CAC1M. Proponemos a continuación una explicación estructural para estas observaciones, basada en los diferentes sitios de unión de estos péptidos en la molécula de CA. CAI se une a CTD en una región que implica parte de las hélices 8 y 9 (Ternois, *et al.*, 2005; Bartonova, *et al.*, 2008). Esta región solapa claramente con la interfase CTD-NTD. El péptido H8, como mimético de la hélice 8, se unirá a NTD. Tanto la unión de CAI como la de H8 impedirán estéricamente la misma reacción de asociación CTD-NTD, lo que explica la ausencia de efecto aditivo alguno al mezclar ambos péptidos. Por otra parte, el sitio de unión de CAI en CTD se encuentra cerca de la interfase CTD-CTD, por lo que la unión de CAI puede, además de bloquear la interacción CTD-NTD, alterar alostéricamente la interfase CTD-CTD, sin evitar la formación del dímero de CTD pero impidiendo la correcta organización de la estructura cuaternaria en la cápsida madura (Sticht, *et al.*, 2005; Ternois, *et al.*, 2005; Bartonova, *et al.*, 2008; Zhang, *et al.*, 2008). El sitio de unión de los péptidos CAC1 y CAC1M solapa con la interfase CTD-CTD, por lo que estos péptidos deben impedir estéricamente la dimerización de CTD. Puesto que los sitios de unión a CTD de los péptidos CAI y CAC1/CAC1M no son solapantes y sus mecanismos de inhibición difieren, la mezcla de ambos péptidos debería producir un efecto mayor que el de cada uno por separado, lo que corresponde a lo observado. Además, el reordenamiento conformacional inducido en CTD a causa de la unión de CAI podría potenciar la unión de CAC1/CAC1M (y/o viceversa), conduciendo al efecto sinérgico observado para las mezclas de CAI con CAC1 o CAC1M. Finalmente, la unión de CAC1 o CAC1M a CTD y de H8 a NTD en regiones independientes implicadas en distintas interfases produciría un efecto aditivo sencillo, como el que hemos observado.

De modo análogo a las actuales terapias de combinación, estas observaciones suministran un apoyo adicional a la idea de usar mezclas de inhibidores interfásicos del ensamblaje de la cápsida vírica en lugar de un único inhibidor de ensamblaje, por potente que sea, para reducir la dosis de cada péptido y minimizar sus efectos secundarios individuales, y/o para reducir la probabilidad de que surjan virus variantes resistentes al tratamiento, puesto que tales variantes necesitarían acumular mutaciones en las diferentes interfases de oligomerización a las que se unen los diferentes péptidos de la mezcla.

3.5. Actividad antiviral de los péptidos interfásicos

El estudio que hemos realizado ha contemplado el diseño o modificación racional, el análisis estructural y la evaluación de péptidos como inhibidores del ensamblaje de partículas con la organización estructural de la cápsida madura de VIH-1. La utilización de un modelo de ensamblaje *in vitro* ha permitido demostrar claramente la acción inhibitoria de estos péptidos específicamente sobre el proceso de ensamblaje de la cápsida madura, que era el proceso que se pretendía inhibir mediante el diseño racional seguido. Este estudio deberá ser seguido de un análisis *ex vivo* de los efectos de estos péptidos, que en la célula podrían no limitarse a la inhibición del ensamblaje de la cápsida madura, o modularse de otras maneras. En cualquier caso, para probar que los inhibidores de ensamblaje diseñados y probados *in vitro* tienen realmente actividad antiviral, el grupo del Dr. Miguel Ángel Martínez realizó, en colaboración con nosotros, algunos experimentos iniciales *ex vivo*, encaminados a conseguir su transporte al interior de células, y a probar su capacidad de inhibir la infección de éstas por VIH-1.

Al igual que se observó en los experimentos de inhibición de la polimerización *in vitro* de CA, en los experimentos de inhibición de la infección de células en cultivo por VIH-1 la mezcla de los péptidos CAI+H8 no resultó más activa que los péptidos usados de forma separada, mientras que una mezcla de CAC1(o CAC1M) con CAI o H8 mostró un incremento sustancial de su capacidad inhibitoria de la infección por el virus con respecto a los péptidos por separado. Esta observación suministra un primer apoyo a la sugerencia de que la actividad antiviral de estos péptidos *ex vivo*, como se esperaba, está relacionada con la inhibición del ensamblaje de la cápsida madura. Podría argumentarse que, a menos que los péptidos se incorporen en concentraciones suficientemente elevadas en los viriones en formación, la inhibición del ensamblaje de la cápsida madura dentro del virión no podría tener lugar. Sin embargo, es preciso hacer notar que las interfases CTD-CTD y CTD-NTD observadas en la cápsida pueden no participar en el ensamblaje de la cápsida inmadura mientras en virión se está formando en el interior celular (Ganser-Pornillos, *et al.*, 2008; Mateu, 2009). Por tanto, los miles de moléculas de Gag que se ensamblan para formar la cápsida inmadura podrían unir cantidades sustanciales de péptidos CAC1, CAC1M y H8 en sus sitios de unión, que no resultarían bloqueados, incrementando localmente la concentración de estos péptidos dentro del virión. Es preciso hacer notar también que la eficacia del transporte de estos péptidos al interior celular mediante un péptido transportador es mejorable, en cuyo caso la actividad inhibitoria sobre la infección por VIH-1 de estos péptidos y sus mezclas podría incrementarse sin aumentar la dosis de péptidos.

En conclusión, los péptidos CAC1, CAC1M y H8 diseñados racionalmente para mimetizar la secuencia de hélices implicadas en las interfases de ensamblaje de la cápsida madura de CA pueden actuar como inhibidores eficientes del ensamblaje *in vitro* y de la infección *ex vivo* por VIH-1. Además, el uso de mezclas de inhibidores peptídicos puede

conducir a efectos inhibitorios notablemente mejores tanto sobre el ensamblaje de la cápsida como sobre la infección por VIH-1.

4. Diferentes soluciones estructurales en la interfase de dimerización entre subunidades de la cápsida de VIH-1 permiten mantener la afinidad del reconocimiento molecular

A partir del estudio estructural y la disección de las características termodinámicas de la interfase de dimerización CTD-CTD, y del diseño y análisis de péptidos inhibidores del ensamblaje de la cápsida mediante interferencia con la interacción CTD-CTD, nos planteamos continuar el estudio de los procesos de reconocimiento molecular CTD-CTD y péptido-CTD utilizando variantes combinatoriales tanto de CTD como de los péptidos CAC1 o CAI. Nuestro interés era doble. Por un lado, pretendíamos identificar sustituciones de aminoácidos en CAC1, CAI o CTD que pudieran dar lugar a mejores inhibidores del ensamblaje *in vitro* de CA. Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos venido investigando la aparición de mutaciones compensatorias en interfases entre subunidades de cápsidas víricas y los posibles mecanismos moleculares de la compensación; desde este punto de vista, la identificación mediante aproximaciones combinatoriales de conjuntos de mutaciones que mantuvieran la afinidad de dimerización CTD-CTD constituye para nosotros un interesante modelo experimental muy simple para entender, desde los puntos de vista biofísico y bioquímico, las diferentes soluciones estructurales que compensan variaciones de afinidad y mantienen el proceso de reconocimiento molecular entre subunidades de cápsidas víricas.

Hasta el momento, diferentes dificultades técnicas descritas en el capítulo de Resultados nos han impedido obtener variantes de los péptidos CAC1, CAI o del dominio CTD que presenten una mayor afinidad por CA, y por tanto constituyan inhibidores mejorados del ensamblaje, o que (en el caso de CTD) suministren información acerca de mutaciones que podrían lograr este efecto al ser introducidas en el péptido CAC1 o sus derivados. Sin embargo, la utilización de un método de cribado de colonias que expresan variantes de CTD con afinidad por CA sin mutar, que nosotros pusimos a punto, sí que ha permitido obtener un primer variante combinatorializado con varias sustituciones en la interfase de dimerización que mantiene la afinidad de homodimerización y es capaz de unirse a CA e inhibir, tan eficazmente como el dominio no mutado, el ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1.

El sistema de combinatorialización de CTD y selección mediante cribado de colonias presenta ciertas desventajas con respecto a un sistema más poderoso como la selección mediante presentación en fagos. Por un lado, el número de variantes distintas que es posible explorar es mucho más reducido, al ser un método no selectivo y requerir la comparación de la señal producida por cada variante. Sin embargo, la utilización de un

número suficiente de placas Petri permitió en un primer intento cribar alrededor de 10000 colonias bacterianas que potencialmente expresaban variantes distintos de CTD. El método no es muy cuantitativo, y la intensidad de la señal puede no ser en cada colonia un indicador fiable de la capacidad de unión de la proteína expresada al ligando (la proteína CA en nuestro estudio). Sin embargo, en experimentos de control en que se cribaron dos variantes de CTD que se diferenciaban en afinidad en únicamente un orden de magnitud, se obtuvo un índice de acierto próximo al 80%. Es de suponer, por tanto, que si en la biblioteca de variantes cribada se encontraran presentes algunos mutantes con una afinidad por CA de dos o más órdenes de magnitud, al menos uno de ellos habría podido ser identificados. Puesto que no fue así, no parece irrazonable pensar que entre los 10000 variantes cribados no hay ninguno (o hay muy pocos) de afinidad superior a CA de VIH-1.

Este fue un resultado inesperado: en la interfase de dimerización de CA se han detectado, mediante mutagénesis dirigida mutaciones individuales en algunos de los mismos residuos elegidos para la combinatorialización que aumentan la afinidad de dimerización (en algunos casos debido a que eliminan repulsiones electrostáticas entre los monómeros) (del Alamo, *et al.*, 2003). Sin embargo, es preciso considerar que el aumento conseguido de afinidad mediante esas mutaciones individuales fue en general inferior a un orden de magnitud. Por lo tanto, es posible que las posiciones combinatorializadas, localizadas en la periferia de la interfase de dimerización, no sean después de todo las idóneas para conseguir un gran incremento de afinidad. Para futuros experimentos deberían quizá considerarse residuos localizados en la zona central de la interfase y energéticamente críticos para la dimerización. Un número muy elevado de combinaciones de mutaciones de estos residuos críticos resultará probablemente desfavorable para la afinidad, pero quizá existirá también una mayor probabilidad de encontrar entre ellos alguna combinación de mutaciones que aumente de forma considerable la afinidad. Si la frecuencia de estas combinaciones favorables es, como se espera, muy baja, quizá el método de cribado no sea adecuado para ello y habrá que considerar alguna modificación de un método de presentación y selección de CTD diferente del método de presentación en fagos M13 que hemos intentado en este trabajo.

En cualquier caso, el método de cribado de colonias permitió obtener un variante combinatorial, CTD-19b, que presentó la misma afinidad de dimerización y la misma capacidad de inhibición del ensamblaje *in vitro* de CA que el dominio CTD no mutado. Este resultado suministra una prueba de que la aproximación es válida, y que la aplicación del mismo proceso a otras colonias que dieron resultados positivos, o a nuevas bibliotecas, probablemente puede permitir obtener nuevos variantes de características funcionales similares a CTD y a CTD-19b, pero con otras combinaciones de secuencia en la interfase de dimerización.

El mutante seleccionado CTD-19b resultó interesante debido a las sustituciones que presenta en la interfase de dimerización. Este variante mostró, respecto a CTD parental, cuatro sustituciones, todas ellas en posiciones que habíamos combinatorializado en la hélice 9: E187P, V191G, Q192G y N193G. La prolina es un

residuo que no puede encontrarse en una hélice debido a su incapacidad de participar en el correspondiente patrón de puentes de hidrógeno; la glicina es un aminoácido que tiene poca propensión a participar en hélices. No hemos realizado todavía un estudio de los efectos de cada una de estas mutaciones individuales sobre la afinidad de dimerización. Sin embargo, consideramos probable que este sea un caso especial de mutaciones con efectos compensatorios.

Por ejemplo, la mutación Q192G podría eliminar, como lo hace la mutación Q192A (del Alamo *et al.*, 2003) interacciones desfavorables entre los monómeros, compensando su posible menor propensión a la estructuración de la hélice. Las mutaciones V191A y N193A no producen ninguna disminución de afinidad; es posible que los posibles efectos entálpicos desfavorables de las mutaciones de los mismos residuos a glicina no sean considerables; el efecto entrópico causado por la disminución de la propensión de la hélice 9 conteniendo estos residuos a estructurarse durante la dimerización podría ser compensada por un diferente reordenamiento de otros residuos en la interfase que establezcan interacciones más favorables entre los monómeros. Mención aparte merece la mutación E187P. La presencia de una prolina en el medio de una hélice α regular no es posible. Sin embargo, en la interfase CTD-CTD, la hélice 9 sin mutaciones ya presenta una irregularidad alrededor del residuo contiguo, T188 (Gamble, *et al.*, 1997) (ver Fig. 21b), por lo que la distorsión adicional que causaría la mutación E187P podría no tener unas consecuencias tan sustanciales como podría esperarse en una hélice regular. En cualquier caso, es de esperar (a falta de la determinación de la estructura tridimensional de este variante combinatorial de CTD) que las cuatro mutaciones en CTD-19b distorsionen considerablemente la estructura de la interfase de dimerización. Por tanto, la correcta funcionalidad de CTD-19b apoya la posibilidad de que la interfase de dimerización admita múltiples mutaciones que modifiquen sustancialmente su estereoquímica, sin alterar significativamente la afinidad del reconocimiento molecular. Esta observación amplía otras observaciones que revelan una inusualmente elevada flexibilidad conformacional de este dominio (Worthylake, *et al.*, 1999; Alcaraz, *et al.*, 2007; Alcaraz, *et al.*, 2008; Byeon, *et al.*, 2009).

En resumen, la aproximación realizada mediante cribado de bibliotecas combinatoriales de CTD permitirá un estudio combinatorial más completo de posibles soluciones estructurales diferentes al reconocimiento molecular en la interfase de dimerización de CTD. El variante obtenido por el momento apoya la relativa insensibilidad del reconocimiento molecular CTD-CTD a cambios estructurales sustanciales en esta interfase.

5. La máxima conservación de residuos en la región MHR correlaciona con su importancia para la estabilidad conformacional del monómero de CTD-Δ177, pero no para su dimerización mediante intercambio de dominios

No está todavía claro si la dimerización mediante intercambio de dominios, observada en diversas proteínas celulares y algunas virales (generalmente en condiciones de cristalización), presenta alguna relevancia biológica. En lo que respecta a proteínas de cápsidas víricas, resulta notable que en el virus del moteado amarillo del arroz, el ensamblaje de la cápsida icosaédrica implica un intercambio de dominios que no ocurre en las cápsidas menos estables de otros virus de la misma familia (Qu, *et al.*, 2000). CTD-Δ177, un mutante de delección del dominio CTD de CA de VIH-1, también dimeriza a través de un intercambio de dominios (Ivanov, *et al.*, 2007), y no de la forma en que lo hace CTD_{wt}.

Como en la interfase de intercambio de dominios en CTD-Δ177 está fuertemente implicada la región MHR, altamente conservada y funcionalmente importante para el ensamblaje de la cápsida inmadura y otras diversas etapas del ciclo viral (Mammano, *et al.*, 1994; Provitera, *et al.*, 2001; von Schwedler, *et al.*, 2003; Purdy, *et al.*, 2008), se propuso (sin otra evidencia experimental) que la interfase de intercambio de dominios en CTD podría participar en el ensamblaje de la cápsida inmadura de VIH-1 (Ivanov, *et al.*, 2007). Independientemente de si esta hipótesis es correcta o no, pocas interfases de intercambio de dominios se han caracterizado termodinámicamente y cinéticamente, y en prácticamente ninguna se ha realizado una disección del papel de los residuos aminoacídicos que participan en ella sobre la estabilidad y afinidad del dímero. Por lo tanto, consideramos de interés realizar estos estudios con un doble objetivo: aportar un mayor conocimiento al proceso general de intercambio de dominios en proteínas, y en particular en proteínas implicadas en el ensamblaje de cápsidas víricas, y suministrar alguna evidencia experimental en favor o en contra de la idea de la participación de esta interfase alternativa de dimerización en la morfogénesis de VIH-1.

5.1. Características termodinámicas y cinéticas de la reacción de dimerización de CTD-Δ177 mediante intercambio de dominios

Una primera observación que no apoya un papel del dímero de dominios intercambiados en el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 es la dependencia de la cantidad de dímero formado con la estirpe viral utilizada o las condiciones particulares de ensayo. Los autores que describieron originalmente este dímero utilizando CTD-Δ177 llegaron a

conseguir un 60% de forma dimérica. Sin embargo, en nuestro estudio con este mismo mutante de la misma estirpe viral, la forma dimérica no sobrepasó, a pesar de la búsqueda de las mejores condiciones de dimerización, un 20% en el equilibrio a concentraciones relativamente elevadas de proteína. Además, la utilización de CTD- $\Delta 177$ derivado de una segunda cepa de VIH-1, cuyo CTD se diferencia en únicamente un aminoácido, redujo la proporción de dímero de un 16% a sólo un 5% en las mismas condiciones de ensayo en el equilibrio. Finalmente, la expresión de CTD- $\Delta 177$ como proteína libre, en vez de como proteína de fusión con GST, produjo únicamente la forma monomérica. Es preciso recordar también que la delección $\Delta 177$ en CTD fue artificialmente introducida en el laboratorio, y que en CTD sin mutaciones no se aprecia tendencia a formar dímeros de dominios intercambiados, sino únicamente dímeros formados a través de la interfase presente en la cápsida madura.

Una segunda observación que tampoco favorece un papel funcional para el dímero de dominios intercambiados es que, incluso en el mutante CTD- $\Delta 177$ donde la dimerización por intercambio de dominios está artificialmente favorecida, la constante de equilibrio de disociación del dímero es del orden de mM, cuando las interacciones biológicamente relevantes son casi siempre de mucha mayor afinidad (constantes de disociación del orden de nM o μ M), como ocurre con la dimerización de CA y CTD sin intercambio de dominios.

Una tercera observación en el mismo sentido es que las cinéticas de asociación y disociación de CTD_{wt} sin intercambio de dominios son extraordinariamente rápidas, mientras que las cinéticas de asociación y disociación de CTD- $\Delta 177$ son extremadamente lentas. La gran barrera energética que tiene que salvar CTD- $\Delta 177$ tanto para dimerizar como para disociarse es debida, probablemente, a un mecanismo de asociación que implica el paso por un estado parcialmente desnaturalizado de la proteína, con el monómero en una conformación “abierta”, como se ha descrito para algunas otras proteínas que dimerizan mediante intercambio de dominios (Schymkowitz, *et al.*, 2000; Rousseau, *et al.*, 2001). Es difícil imaginar que un proceso de asociación necesario para el ensamblaje de la cápsida inmadura de VIH-1, o un proceso de disociación necesario para su desensamblaje durante la maduración de VIH-1, pueda tardar muchos días en completarse.

Sin embargo, también es preciso considerar que las condiciones en la célula y en el virión de VIH-1 son muy diferentes a las de una solución diluida donde se han realizado todos estos experimentos, así como experimentos similares con otras proteínas que dimerizan mediante intercambio de dominios. En entornos fuertemente aglomerados como son los fisiológicos, la velocidad de las reacciones de asociación y disociación de complejos macromoleculares, y la posición del equilibrio químico, pueden resultar fuertemente alterados, como se ha comentado en la Introducción y en Resultados. Por tanto, consideramos de interés realizar en el futuro estos estudios de la reacción de dimerización mediante intercambio de dominios, pero en presencia de un agente de aglomeración macromolecular. Es también necesario recordar que en condiciones fisiológicas CTD no se encuentra aislado, sino que forma un dominio de Gag o de CA; en

este entorno molecular aumentará la concentración local de CTD, lo que también puede facilitar reacciones de oligomerización, incluyendo su dimerización mediante intercambio de dominios.

Los resultados de equilibrio y cinéticos obtenidos para la reacción de dimerización de CTD- Δ 177 son similares a los obtenidos para algunas de las pocas proteínas que dimerizan mediante intercambio de dominios y han sido analizadas en este tipo de estudios. En alguno de estos casos, como ocurre en el caso de CTD- Δ 177, la constante de equilibrio de disociación resultó ser del orden de mM, y las reacciones de disociación del dímero o asociación del monómero toman días o incluso meses en completarse. Es, sin embargo, necesario recordar de nuevo que en estos otros casos, la proteína que dimeriza mediante intercambio de dominios con tales constantes termodinámicas y cinéticas es la proteína natural, mientras que CTD- Δ 177 requirió una delección en la región bisagra para alcanzar los valores determinados para la constante de equilibrio y las constantes cinéticas. En comparación, la delección análoga de un aminoácido en otras proteínas que intercambian dominios permitió aumentar la constante de afinidad de dimerización en varios órdenes de magnitud sobre la obtenida para CTD- Δ 177 (Rousseau, *et al.*, 2001).

El modelo más sencillo para explicar el equilibrio de dimerización de CTD- Δ 177 mediante intercambio de dominios implica, como se ha mencionado antes, un proceso de interconversión entre una forma monomérica y una dimérica a través de un estado de transición parcialmente desnaturalizado del monómero. En los experimentos de asociación del monómero hemos observado un buen ajuste a una única reacción bimolecular, dependiente de concentración, consistente con este modelo sencillo. Sin embargo, en los experimentos de disociación del dímero no hemos observado un único proceso exponencial de disociación. Los datos se ajustan bien a la existencia de dos procesos de disociación de dímero a monómero con constantes de velocidad lentas que difieren en dos órdenes de magnitud. Entre otras posibilidades, un modelo tentativo que podría explicar estos resultados es el siguiente: Para CTD- Δ 177 podrían existir dos formas diméricas algo diferentes, quizá con la posibilidad de convertirse una en la otra. Del ajuste de los datos, la forma de interconversión rápida sería dominante. Al tener ambas formas dimensiones similares, su interconversión (de haberla) sería invisible en experimentos de filtración en gel analítica, el método que hemos utilizado para seguir la reacción de disociación. Ambas formas se disociarían lentamente en monómeros, pero una, la dominante, lo haría mucho menos lentamente que la otra. La relación entre la constante cinética de disociación menos lenta y la constante de asociación del monómero rinde una constante de equilibrio de disociación que corresponde aproximadamente a la constante aparente determinada mediante la cuantificación directa de las formas monomérica y dimérica en el equilibrio.

5.2. Análisis del papel en el plegamiento y dimerización de CTD-Δ177 de los residuos que participan en la interfase de intercambio de dominios por péptidos interfásicos

En nuestro conocimiento, hasta la fecha no se había realizado un análisis mutacional mediante *alanine scanning* de ninguna interfase de dimerización mediante dominios intercambiados, ni en proteínas virales ni en proteínas celulares. En CTD-Δ177, la delimitación entre interfase primaria y secundaria no está bien definida. En sentido relativamente estricto, la interfase primaria, constituida por los residuos que participan en las mismas interacciones en el monómero (intramoleculares) y en el dímero (intermoleculares), incluye los residuos Q155, F161 y Y164, todos ellos parte del MHR. La interfase secundaria (constituida por residuos que no establecen el mismo conjunto de interacciones en el monómero y en el dímero) incluye los residuos R154, V165, F168 (que forman parte del MHR), y M185, L189, N193, N195 (que no forman parte del MHR) (Tabla 16)

Los resultados que obtuvimos indican que la mutación individual a alanina de los tres residuos de la interfase primaria, todos ellos pertenecientes al MHR, impide el plegamiento del monómero de CTD-Δ177 (y por tanto también su dimerización) y conduce a la degradación de la proteína en las células donde se expresó. La mutación individual a alanina de los tres residuos de la interfase secundaria que pertenecen al MHR impide en un caso el plegamiento del monómero (provocando la degradación o agregación de la proteína), y en los dos casos restantes reduce significativamente la estabilidad térmica del monómero. La mutación individual a alanina de los cuatro residuos de la interfase secundaria que no pertenecen al MHR parece impedir en un caso el plegamiento del monómero (se observó degradación); en otro caso desestabiliza fuertemente el monómero, conduciendo a degradación y/o agregación parcial; y en los otros dos casos, o no afecta significativamente a la estabilidad térmica del monómero, o incluso aumenta la estabilidad (Tabla 16). En resumen, de los 10 residuos interfásicos ensayados, todos los residuos del MHR, que corresponden a aquellos más conservados entre retrovirus, impiden el plegamiento del monómero de CTD-Δ177 o lo desestabilizan significativamente. Por el contrario, solo la mitad de los residuos no pertenecientes al MHR impiden el plegamiento o reducen la estabilidad del monómero.

Es importante hacer notar que la evidencia estructural y termodinámica obtenida indica claramente que la conformación del monómero de CTD-Δ177 es muy similar a la de CTD_{wt}. En particular, resulta revelador que la estabilidad conformacional de ambos monómeros sea la misma. Por tanto, el efecto de las mutaciones realizadas sobre la estabilidad del monómero CTD_{wt} será con toda probabilidad muy similar al efecto que observamos sobre la estabilidad del monómero de CTD-Δ177.

Es interesante destacar que diversas mutaciones de los residuos del MHR que impiden el plegamiento del monómero de CTD (Q155, F161, Y164, F168), o sus equivalentes en otros retrovirus, produjeron defectos funcionales en el ciclo vírico. Q155A y Y164A resultaron letales para la infección por VIH-1; una mutación más

conservadora de Y164 (Y164F) produjo una alteración en la producción de cápsidas inmaduras (Mammano, *et al.*, 1994), y una mutación en posición equivalente en VSR (F167Y) causó defectos en la infectividad y en la producción de cápsidas (Purdy, *et al.*, 2008); En VSR, la mutación L171V (residuo equivalente a F168 en VIH-1), dio lugar a viriones no infectivos en los que Gag es capaz de ensamblar, pero no pueden formarse cápsidas maduras de CA (Purdy, *et al.*, 2008).

El análisis del efecto de la mutación a alanina de los 6 residuos (todos situados en la interfase secundaria) que no impedían el plegamiento del monómero sobre la dimerización de CTD- Δ 177 mediante intercambio de dominios, reveló que sólo uno de los tres residuos localizados en el MHR era necesario para la dimerización, mientras que la mutación de los otros dos no modificaba apreciablemente la afinidad de dimerización. En cambio, la mutación individual de los tres residuos localizados fuera del MHR impidió o redujo significativamente la dimerización (Tabla 16).

Los resultados que hemos obtenido apoyan un papel esencial de residuos del MHR extremadamente conservados en retrovirus en el plegamiento del dominio C-terminal de la proteína de la cápsida CA. Mutaciones en estos residuos desestabilizarán fuertemente este dominio o llegarán a impedir su plegamiento, conduciendo a su degradación o agregación; esta sería la causa principal subyacente a los diferentes efectos funcionales de mutaciones en el MHR sobre diferentes etapas del ciclo retroviral en que Gag o CA están implicadas. De modo consistente con esta conclusión, los residuos conservados en el MHR parecen ser importantes para la dimerización de CTD- Δ 177 mediante intercambio de dominios, pero principalmente de modo indirecto, es decir a través de su implicación en el plegamiento del monómero. En la interfase secundaria, donde se pudo analizar el efecto de mutaciones sobre la dimerización de modo (parcialmente) desacoplado de su efecto sobre el plegamiento del monómero, los dos variantes con mutaciones en el MHR que no impidieron el plegamiento desestabilizaron el monómero, y en cambio fueron capaces de dimerizar normalmente. Por el contrario, los dos variantes con mutaciones fuera del MHR que no desestabilizaron apreciablemente el monómero, mostraron una capacidad de dimerización significativamente reducida.

En resumen, los residuos más conservados en el MHR son necesarios para el plegamiento del monómero de CTD y afectan sólo indirectamente a su dimerización mediante intercambio de dominios y, probablemente, a otras funciones que dependen del correcto plegamiento de CTD como parte de CA o de Gag. Los residuos más importantes para la dimerización de CTD mediante intercambio de dominios (en cuanto a un papel directo en interacciones intermoleculares en la interfase secundaria, sin afectar sustancialmente al plegamiento del monómero) no corresponden en general a residuos situados en el MHR.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, tomados en conjunto, no parecen apoyar la idea de que esta interfase de intercambio de dominios participe permanente o transitoriamente en el ensamblaje de la cápsida de VIH-1. No obstante, esta posibilidad no puede descartarse completamente sin estudios más directos, en particular en un

entorno aglomerado como el existente en la célula infectada o en el virión de VIH-1. En esas condiciones *in vivo*, no es irrazonable suponer que el proceso de intercambio de dominios pudiera ocurrir también en CTD_{wt}. De tener lugar *in vivo*, el intercambio de dominios en CA no necesariamente tendría que jugar un papel positivo durante el ensamblaje, sino que tal vez podría actuar de modo negativo, facilitando procesos de agregación improductivos (Schlunegger, *et al.*, 1997; Rousseau, *et al.*, 2003). No obstante, basándonos en la evidencia previa y en nuestros resultados, nos inclinamos a pensar que esta capacidad potencial de CTD para el intercambio de dominios puede ser un remanente evolutivo de una reacción que tendría más importancia (positiva o negativa) en otras proteínas, ancestrales o actuales, de la familia a la que pertenece CTD (Bennett y Eisenberg, 2004; Ivanov, *et al.*, 2005).

Finalmente, nuestro estudio sobre esta interfase alternativa en CTD aporta evidencia adicional a nuestra idea de que el MHR está conservado e implicado en tantas funciones virales relacionadas con Gag y CA simplemente porque tiene una importancia extrema para el plegamiento correcto y estable del dominio CTD (Mateu, 2002). Si CTD no está plegado o es inestable debido a una mutación en el MHR, no es sorprendente que todas las funciones en las que participa CTD (como parte de CA o Gag) resulten afectadas. Una sola razón básica explicaría de este modo el efecto sorprendentemente pleiotrópico del MHR.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La hexamerización de la proteína de la cápsida de VIH-1 durante el ensamblaje de la cápsida madura requiere un reordenamiento conformacional previo de su dominio C-terminal, CTD, que ocurre durante la homodimerización de éste. Sin este reordenamiento no es posible la hexamerización ni siquiera en un entorno macromolecularmente aglomerado similar al existente en el virión.
2. La acción de inhibidores pequeños del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 se reduce sustancialmente en condiciones de aglomeración macromolecular cercanas a las fisiológicas, como había predicho la teoría de aglomeración molecular.
3. Diferentes péptidos diseñados de modo racional para mimetizar elementos estructurales (hélices) implicadas en diferentes interfaces de oligomerización entre subunidades de la cápsida madura de VIH-1 actúan *in vitro* como inhibidores eficaces del ensamblaje de ésta. Combinaciones de estos péptidos permiten inhibir completamente el ensamblaje de la cápsida madura a dosis menores de cada uno, y presentan una significativa actividad antiviral en células infectadas por VIH-1.
4. Diferentes soluciones estructurales en la interfase de dimerización entre subunidades de la cápsida de VIH-1 permiten mantener la afinidad del reconocimiento molecular.
5. Residuos muy conservados en la región MHR son importantes para la estabilidad conformacional, pero no para la dimerización alternativa del dominio C-terminal de la proteína de la cápsida (variante CTD- Δ 177) mediante intercambio de elementos estructurales entre monómeros (*domain swapping*).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdurahman, S, Vegvari, A, Youssefi, M, Levi, M, Hoglund, S, Andersson, E, Horal, P, Svennerholm, B, Balzarini, J y Vahlne, A (2008) Activity of the small modified amino acid alpha-hydroxy glycineamide on in vitro and in vivo human immunodeficiency virus type 1 capsid assembly and infectivity. *Antimicrob Agents Chemother* 52 3737-3744
- Adamson, CS y Jones, IM (2004) The molecular basis of HIV capsid assembly--five years of progress. *Rev Med Virol* 14 107-121
- Ako-Adjei, D, Johnson, MC y Vogt, VM (2005) The retroviral capsid domain dictates virion size, morphology, and coassembly of gag into virus-like particles. *J Virol* 79 13463-13472
- Alcaraz, LA, del Alamo, M, Barrera, FN, Mateu, MG y Neira, JL (2007) Flexibility in HIV-1 assembly subunits: solution structure of the monomeric C-terminal domain of the capsid protein. *Biophys J* 93 1264-1276
- Alcaraz, LA, Del Alamo, M, Mateu, MG y Neira, JL (2008) Structural mobility of the monomeric C-terminal domain of the HIV-1 capsid protein. *FEBS J* 275 3299-3311
- Andersson, E, Horal, P, Jecic, A, Hoglund, S, Balzarini, J, Vahlne, A y Svennerholm, B (2005) Glycine-amide is an active metabolite of the antiretroviral tripeptide glycyl-prolyl-glycine-amide. *Antimicrob Agents Chemother* 49 40-44
- Ando, T y Skolnick, J (2010) Crowding and hydrodynamic interactions likely dominate in vivo macromolecular motion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 18457-18462
- Arndt, KM, Muller, KM y Pluckthun, A (1998) Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry* 37 12918-12926
- Barbas, CF, 3rd, Burton, DR, Scott, JK y Silverman, GJ (2001) Phage Display: A Laboratory Manual. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Barbas, CF, 3rd, Kang, AS, Lerner, RA y Benkovic, SJ (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 7978-7982
- Barklis, E, Alfadhli, A, McQuaw, C, Yalamuri, S, Still, A, Barklis, RL, Kukull, B y Lopez, CS (2009) Characterization of the in vitro HIV-1 capsid assembly pathway. *J Mol Biol* 387 376-389
- Bartonova, V, Igonet, S, Sticht, J, Glass, B, Habermann, A, Vaney, MC, Sehr, P, Lewis, J, Rey, FA y Krausslich, HG (2008) Residues in the HIV-1 capsid assembly inhibitor binding site are essential for maintaining the assembly-competent quaternary structure of the capsid protein. *J Biol Chem* 283 32024-32033
- Batra, J, Xu, K y Zhou, HX (2009) Nonadditive effects of mixed crowding on protein stability. *Proteins* 77 133-138

- Bennett, MJ, Choe, S y Eisenberg, D (1994) Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 3127-3131
- Bennett, MJ y Eisenberg, D (2004) The evolving role of 3D domain swapping in proteins. *Structure* 12 1339-1341
- Bennett, MJ, Schlunegger, MP y Eisenberg, D (1995) 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci* 4 2455-2468
- Bhattacharya, S, Zhang, H, Debnath, AK y Cowburn, D (2008) Solution structure of a hydrocarbon stapled peptide inhibitor in complex with monomeric C-terminal domain of HIV-1 capsid. *J Biol Chem* 283 16274-16278
- Blair, WS, Pickford, C, Irving, SL, Brown, DG, Anderson, M, Bazin, R, Cao, J, Ciaramella, G, Isaacson, J, Jackson, L, *et al* (2010) HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention. *PLoS Pathog* 6 e1001220
- Bogan, AA y Thorn, KS (1998) Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* 280 1-9
- Bon Homme, M, Carter, C y Scarlata, S (2005) The cysteine residues of HIV-1 capsid regulate oligomerization and cyclophilin A-induced changes. *Biophys J* 88 2078-2088
- Borsetti, A, Ohagen, A y Gottlinger, HG (1998) The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly. *J Virol* 72 9313-9317
- Bourne, Y, Arvai, AS, Bernstein, SL, Watson, MH, Reed, SI, Endicott, JE, Noble, ME, Johnson, LN y Tainer, JA (1995) Crystal structure of the cell cycle-regulatory protein suc1 reveals a beta-hinge conformational switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 10232-10236
- Bourne, Y, Watson, MH, Arvai, AS, Bernstein, SL, Reed, SI y Tainer, JA (2000) Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions. *Structure* 8 841-850
- Briggs, JA, Riches, JD, Glass, B, Bartonova, V, Zanetti, G y Krausslich, HG (2009) Structure and assembly of immature HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 11090-11095
- Briggs, JA, Simon, MN, Gross, I, Krausslich, HG, Fuller, SD, Vogt, VM y Johnson, MC (2004) The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 11 672-675
- Briggs, JA, Wilk, T, Welker, R, Krausslich, HG y Fuller, SD (2003) Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* 22 1707-1715
- Buczek, O, Green, BR y Bulaj, G (2007) Albumin is a redox-active crowding agent that promotes oxidative folding of cysteine-rich peptides. *Biopolymers* 88 8-19

- Byeon, IJ, Meng, X, Jung, J, Zhao, G, Yang, R, Ahn, J, Shi, J, Concel, J, Aiken, C, Zhang, P, *et al* (2009) Structural convergence between Cryo-EM and NMR reveals intersubunit interactions critical for HIV-1 capsid function. *Cell* 139 780-790
- Cardone, G, Purdy, JG, Cheng, N, Craven, RC y Steven, AC (2009) Visualization of a missing link in retrovirus capsid assembly. *Nature* 457 694-698
- Carlson, LA, de Marco, A, Oberwinkler, H, Habermann, A, Briggs, JA, Krausslich, HG y Grunewald, K Cryo electron tomography of native HIV-1 budding sites. *PLoS Pathog* 6 e1001173
- Chauhan, AS, Diwan, PV, Jain, NK y Tomalia, DA (2009) Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *Biomacromolecules* 10 1195-1202
- Chen, YW, Stott, K y Perutz, MF (1999) Crystal structure of a dimeric chymotrypsin inhibitor 2 mutant containing an inserted glutamine repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 1257-1261
- Chen, Z, Zheng, KW, Hao, YH y Tan, Z (2009) Reduced or diminished stabilization of the telomere G-quadruplex and inhibition of telomerase by small chemical ligands under molecular crowding condition. *J Am Chem Soc* 131 10430-10438
- Chirgadze, DY, Demydchuk, M, Becker, M, Moran, S y Paoli, M (2004) Snapshot of protein structure evolution reveals conservation of functional dimerization through intertwined folding. *Structure* 12 1489-1494
- Cole, JL (2004) Analysis of heterogeneous interactions. *Methods Enzymol* 384 212-232
- Collins, T, Stone, JR y Williams, AJ (2001) All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol Cell Biol* 21 3609-3615
- Darling, PJ, Holt, JM y Ackers, GK (2000) Coupled energetics of lambda cro repressor self-assembly and site-specific DNA operator binding I: analysis of cro dimerization from nanomolar to micromolar concentrations. *Biochemistry* 39 11500-11507
- De Clercq, E (2002) New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1587 258-275
- de Marco, A, Davey, NE, Ulbrich, P, Phillips, JM, Lux, V, Riches, JD, Fuzik, T, Ruml, T, Krausslich, HG, Vogt, VM, *et al* (2010a) Conserved and variable features of Gag structure and arrangement in immature retrovirus particles. *J Virol* 84 11729-11736
- de Marco, A, Muller, B, Glass, B, Riches, JD, Krausslich, HG y Briggs, JA (2010b) Structural analysis of HIV-1 maturation using cryo-electron tomography. *PLoS Pathog* 6 e1001215
- del Alamo, M y Mateu, MG (2005) Electrostatic repulsion, compensatory mutations, and long-range non-additive effects at the dimerization interface of the HIV capsid protein. *J Mol Biol* 345 893-906

- del Alamo, M, Neira, JL y Mateu, MG (2003) Thermodynamic dissection of a low affinity protein-protein interface involved in human immunodeficiency virus assembly. *J Biol Chem* 278 27923-27929
- del Alamo, M, Rivas, G y Mateu, MG (2005) Effect of macromolecular crowding agents on human immunodeficiency virus type 1 capsid protein assembly in vitro. *J Virol* 79 14271-14281
- Domenech, R, Abian, O, Bocanegra, R, Correa, J, Sousa-Herves, A, Riguera, R, Mateu, MG, Fernandez-Megia, E, Velazquez-Campoy, A y Neira, JL (2010) Dendrimers as potential inhibitors of the dimerization of the capsid protein of HIV-1. *Biomacromolecules* 11 2069-2078
- Dominak, LM y Keating, CD (2008) Macromolecular crowding improves polymer encapsulation within giant lipid vesicles. *Langmuir* 24 13565-13571
- Dominak, LM, Omiatek, DM, Gundermann, EL, Heien, ML y Keating, CD Polymeric crowding agents improve passive biomacromolecule encapsulation in lipid vesicles. *Langmuir* 26 13195-13200
- Dorfman, T, Bukovsky, A, Ohagen, A, Hoglund, S y Gottlinger, HG (1994) Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68 8180-8187
- Douglas, CC, Thomas, D, Lanman, J y Prevelige, PE, Jr. (2004) Investigation of N-terminal domain charged residues on the assembly and stability of HIV-1 CA. *Biochemistry* 43 10435-10441
- Du, F, Zhou, Z, Mo, ZY, Shi, JZ, Chen, J y Liang, Y (2006) Mixed macromolecular crowding accelerates the refolding of rabbit muscle creatine kinase: implications for protein folding in physiological environments. *J Mol Biol* 364 469-482
- Ehrlich, LS, Agresta, BE y Carter, CA (1992) Assembly of recombinant human immunodeficiency virus type 1 capsid protein in vitro. *J Virol* 66 4874-4883
- Ehrlich, LS, Liu, T, Scarlata, S, Chu, B y Carter, CA (2001) HIV-1 capsid protein forms spherical (immature-like) and tubular (mature-like) particles in vitro: structure switching by pH-induced conformational changes. *Biophys J* 81 586-594
- Erickson-Viitanen, S, Manfredi, J, Viitanen, P, Tribe, DE, Tritch, R, Hutchison, CA, 3rd, Loeb, DD y Swanstrom, R (1989) Cleavage of HIV-1 gag polyprotein synthesized in vitro: sequential cleavage by the viral protease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 5 577-591
- Fink, AL (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* 3 R9-23
- Fischer, M, Appelhans, D, Schwarz, S, Klajnert, B, Bryszewska, M, Voit, B y Rogers, M Influence of surface functionality of poly(propylene imine) dendrimers on protease resistance and propagation of the scrapie prion protein. *Biomacromolecules* 11 1314-1325

- Fodeke, AA y Minton, AP (2010) Quantitative characterization of polymer-polymer, protein-protein, and polymer-protein interaction via tracer sedimentation equilibrium. *J Phys Chem B* 114 10876-10880
- Forshey, BM, von Schwedler, U, Sundquist, WI y Aiken, C (2002) Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol* 76 5667-5677
- Fuller, SD, Wilk, T, Gowen, BE, Krausslich, HG y Vogt, VM (1997) Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Curr Biol* 7 729-738
- Gamble, TR, Yoo, S, Vajdos, FF, von Schwedler, UK, Worthylake, DK, Wang, H, McCutcheon, JP, Sundquist, WI y Hill, CP (1997) Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278 849-853
- Ganser-Pornillos, BK, Cheng, A y Yeager, M (2007) Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell* 131 70-79
- Ganser-Pornillos, BK, von Schwedler, UK, Stray, KM, Aiken, C y Sundquist, WI (2004) Assembly properties of the human immunodeficiency virus type 1 CA protein. *J Virol* 78 2545-2552
- Ganser-Pornillos, BK, Yeager, M y Sundquist, WI (2008) The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18 203-217
- Ganser, BK, Li, S, Klishko, VY, Finch, JT y Sundquist, WI (1999) Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* 283 80-83
- Garzon, MT, Lidon-Moya, MC, Barrera, FN, Prieto, A, Gomez, J, Mateu, MG y Neira, JL (2004) The dimerization domain of the HIV-1 capsid protein binds a capsid protein-derived peptide: a biophysical characterization. *Protein Sci* 13 1512-1523
- Gitti, RK, Lee, BM, Walker, J, Summers, MF, Yoo, S y Sundquist, WI (1996) Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 273 231-235
- Goldschmidt, L, Teng, PK, Riek, R y Eisenberg, D (2010) Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 3487-3492
- Gross, I, Hohenberg, H y Krausslich, HG (1997) In vitro assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus. *Eur J Biochem* 249 592-600
- Gross, I, Hohenberg, H, Wilk, T, Wieggers, K, Grattinger, M, Muller, B, Fuller, S y Krausslich, HG (2000) A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *EMBO J* 19 103-113
- Hancock, R y Hadj-Sahraoui, Y (2009) Isolation of cell nuclei using inert macromolecules to mimic the crowded cytoplasm. *PLoS One* 4 e7560

- Hayes, MV, Sessions, RB, Brady, RL y Clarke, AR (1999) Engineered assembly of intertwined oligomers of an immunoglobulin chain. *J Mol Biol* 285 1857-1867
- Heegaard, PM, Boas, U y Otzen, DE (2007) Dendrimer effects on peptide and protein fibrillation. *Macromol Biosci* 7 1047-1059
- Höglund, S, Su, J, Reneby, SS, Vegvari, A, Hjerten, S, Sintorn, IM, Foster, H, Wu, YP, Nystrom, I y Vahlne, A (2002) Tripeptide interference with human immunodeficiency virus type 1 morphogenesis. *Antimicrob Agents Chemother* 46 3597-3605
- Holm, L y Sander, C (1995) Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem Sci* 20 478-480
- Homchaudhuri, L, Sarma, N y Swaminathan, R (2006) Effect of crowding by dextrans and Ficolls on the rate of alkaline phosphatase-catalyzed hydrolysis: a size-dependent investigation. *Biopolymers* 83 477-486
- Homouz, D, Stagg, L, Wittung-Stafshede, P y Cheung, MS (2009) Macromolecular crowding modulates folding mechanism of alpha/beta protein apoflavodoxin. *Biophys J* 96 671-680
- Howlett, GJ, Minton, AP y Rivas, G (2006) Analytical ultracentrifugation for the study of protein association and assembly. *Curr Opin Chem Biol* 10 430-436
- Ispolatov, I, Yuryev, A, Mazo, I y Maslov, S (2005) Binding properties and evolution of homodimers in protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res* 33 3629-3635
- Ivanov, D, Stone, JR, Maki, JL, Collins, T y Wagner, G (2005) Mammalian SCAN domain dimer is a domain-swapped homolog of the HIV capsid C-terminal domain. *Mol Cell* 17 137-143
- Ivanov, D, Tsodikov, OV, Kasanov, J, Ellenberger, T, Wagner, G y Collins, T (2007) Domain-swapped dimerization of the HIV-1 capsid C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 4353-4358
- Jiao, M, Li, HT, Chen, J, Minton, AP y Liang, Y (2010) Attractive protein-polymer interactions markedly alter the effect of macromolecular crowding on protein association equilibria. *Biophys J* 99 914-923
- Karimata, H, Nakano, S y Sugimoto, N (2006) The roles of cosolutes on the hammerhead ribozyme activity. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 81-82
- Kelley, LL y Momany, C (2003) Generation of a phagemid mouse recombinant antibody fragment library by multisite-directed mutagenesis. *Biotechniques* 35 750-752, 754, 756 passim
- Kelly, BN, Howard, BR, Wang, H, Robinson, H, Sundquist, WI y Hill, CP (2006) Implications for viral capsid assembly from crystal structures of HIV-1 Gag(1-278) and CA(N)(133-278). *Biochemistry* 45 11257-11266

- Kelly, BN, Kyere, S, Kinde, I, Tang, C, Howard, BR, Robinson, H, Sundquist, WI, Summers, MF y Hill, CP (2007) Structure of the antiviral assembly inhibitor CAP-1 complex with the HIV-1 CA protein. *J Mol Biol* 373 355-366
- Khazanovich, N, Bateman, K, Chernai, M, Michalak, M y James, M (1996) Crystal structure of the yeast cell-cycle control protein, p13suc1, in a strand-exchanged dimer. *Structure* 4 299-309
- Lanman, J, Lam, TT, Barnes, S, Sakalian, M, Emmett, MR, Marshall, AG y Prevelige, PE, Jr. (2003) Identification of novel interactions in HIV-1 capsid protein assembly by high-resolution mass spectrometry. *J Mol Biol* 325 759-772
- Lanman, J, Sexton, J, Sakalian, M y Prevelige, PE, Jr. (2002) Kinetic analysis of the role of intersubunit interactions in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein assembly in vitro. *J Virol* 76 6900-6908
- Laue, TM, Shah, BD, Ridgeway, TM y Pelletier, SL (1992) Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science. . (Cambridge, Royal Society of Chemistry)
- Lebowitz, J, Lewis, MS y Schuck, P (2002) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci* 11 2067-2079
- Levy, ED, Boeri Erba, E, Robinson, CV y Teichmann, SA (2008) Assembly reflects evolution of protein complexes. *Nature* 453 1262-1265
- Li, S, Hill, CP, Sundquist, WI y Finch, JT (2000) Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* 407 409-413
- Lidon-Moya, MC, Barrera, FN, Bueno, M, Perez-Jimenez, R, Sancho, J, Mateu, MG y Neira, JL (2005) An extensive thermodynamic characterization of the dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Protein Sci* 14 2387-2404
- Luna, E, Rodriguez-Huete, A, Rincon, V, Mateo, R y Mateu, MG (2009) Systematic study of the genetic response of a variable virus to the introduction of deleterious mutations in a functional capsid region. *J Virol* 83 10140-10151
- Mammano, F, Ohagen, A, Hoglund, S y Gottlinger, HG (1994) Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J Virol* 68 4927-4936
- Mascarenhas, AP y Musier-Forsyth, K (2009) The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors. *FEBS J* 276 6118-6127
- Match, H, Volkin, DB, Burke, CJ y Middaugh, CR (1995) Ultraviolet absorption spectroscopy. (Totowa, NJ, Humana Press Inc.)
- Mateo, R, Luna, E y Mateu, MG (2007) Thermostable variants are not generally represented in foot-and-mouth disease virus quasispecies. *J Gen Virol* 88 859-864

- Mateu, MG (2002) Conformational stability of dimeric and monomeric forms of the C-terminal domain of human immunodeficiency virus-1 capsid protein. *J Mol Biol* 318 519-531
- Mateu, MG (2009) The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. *FEBS J* 276 6098-6109
- Mateu, MG y Fersht, AR (1998) Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *EMBO J* 17 2748-2758
- Mayo, K, Huseby, D, McDermott, J, Arvidson, B, Finlay, L y Barklis, E (2003) Retrovirus capsid protein assembly arrangements. *J Mol Biol* 325 225-237
- Minton, AP (1983) The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences. *Mol Cell Biochem* 55 119-140
- Minton, AP (1993) Macromolecular crowding and molecular recognition. *J Mol Recognit* 6 211-214
- Minton, AP (1994) Modern analytical ultracentrifugation. (Boston, Birkhauser)
- Minton, AP (1996) Modern Analytical Ultracentrifugation. (Birkhauser, Boston)
- Minton, AP (1998) Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods Enzymol* 295 127-149
- Minton, AP (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem* 276 10577-10580
- Momany, C, Kovari, LC, Prongay, AJ, Keller, W, Gitti, RK, Lee, BM, Gorbalenya, AE, Tong, L, McClure, J, Ehrlich, LS, *et al* (1996) Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. *Nat Struct Biol* 3 763-770
- Mortuza, GB, Haire, LF, Stevens, A, Smerdon, SJ, Stoye, JP y Taylor, IA (2004) High-resolution structure of a retroviral capsid hexameric amino-terminal domain. *Nature* 431 481-485
- Neira, JL (2009) The capsid protein of human immunodeficiency virus: designing inhibitors of capsid assembly. *FEBS J* 276 6110-6117
- Nermut, MV, Hockley, DJ, Jowett, JB, Jones, IM, Garreau, M y Thomas, D (1994) Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus. *Virology* 198 288-296
- Noviello, CM, Lopez, CS, Kukull, B, McNett, H, Still, A, Eccles, J, Sloan, R y Barklis, E (2011) Second-Site Compensatory Mutations of HIV-1 Capsid Mutations. *J Virol* 85 4730-4738

- Pastor, I, Vilaseca, E, Madurga, S, Garces, JL, Cascante, M y Mas, F Effect of Crowding by Dextrans on the Hydrolysis of N-Succinyl-L-phenyl-Ala-p-nitroanilide Catalyzed by alpha-Chymotrypsin. *J Phys Chem B* 115 1115-1121
- Pawlicki, S, Le Behec, A y Delamarche, C (2008) AMYPdb: a database dedicated to amyloid precursor proteins. *BMC Bioinformatics* 9 273
- Pornillos, O, Ganser-Pornillos, BK, Kelly, BN, Hua, Y, Whitby, FG, Stout, CD, Sundquist, WI, Hill, CP y Yeager, M (2009) X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell* 137 1282-1292
- Pornillos, O, Ganser-Pornillos, BK y Yeager, M (2011) Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* 469 424-427
- Provitera, P, Goff, A, Harenberg, A, Bouamr, F, Carter, C y Scarlata, S (2001) Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag. *Biochemistry* 40 5565-5572
- Purdy, JG, Flanagan, JM, Ropson, IJ, Rennoll-Bankert, KE y Craven, RC (2008) Critical role of conserved hydrophobic residues within the major homology region in mature retroviral capsid assembly. *J Virol* 82 5951-5961
- Qu, C, Liljas, L, Opalka, N, Brugidou, C, Yeager, M, Beachy, RN, Fauquet, CM, Johnson, JE y Lin, T (2000) 3D domain swapping modulates the stability of members of an icosahedral virus group. *Structure* 8 1095-1103
- Reicin, AS, Ohagen, A, Yin, L, Hoglund, S y Goff, SP (1996) The role of Gag in human immunodeficiency virus type 1 virion morphogenesis and early steps of the viral life cycle. *J Virol* 70 8645-8652
- Rivas, G, Fernandez, JA y Minton, AP (1999) Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: theory, experiment, and biological significance. *Biochemistry* 38 9379-9388
- Rousseau, F, Schymkowitz, JW y Itzhaki, LS (2003) The unfolding story of three-dimensional domain swapping. *Structure* 11 243-251
- Rousseau, F, Schymkowitz, JW, Wilkinson, HR y Itzhaki, LS (2001) Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 5596-5601
- Sander, TL, Stringer, KF, Maki, JL, Szauter, P, Stone, JR y Collins, T (2003) The SCAN domain defines a large family of zinc finger transcription factors. *Gene* 310 29-38
- Schlunegger, MP, Bennett, MJ y Eisenberg, D (1997) Oligomer formation by 3D domain swapping: a model for protein assembly and misassembly. *Adv Protein Chem* 50 61-122
- Schuck, P (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* 78 1606-1619

- Schuck, P, Perugini, MA, Gonzales, NR, Howlett, GJ y Schubert, D (2002) Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J* 82 1096-1111
- Schymkowitz, JW, Rousseau, F, Irvine, LR y Itzhaki, LS (2000) The folding pathway of the cell-cycle regulatory protein p13suc1: clues for the mechanism of domain swapping. *Structure* 8 89-100
- Shcharbin, D, Pedziwiatr, E, Chonco, L, Bermejo-Martin, JF, Ortega, P, de la Mata, FJ, Eritja, R, Gomez, R, Klajnert, B, Bryszewska, M, *et al* (2007) Analysis of interaction between dendriplexes and bovine serum albumin. *Biomacromolecules* 8 2059-2062
- Shi, J, Zhou, J, Shah, VB, Aiken, C y Whitby, K (2011) Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization. *J Virol* 85 542-549
- Sticht, J, Humbert, M, Findlow, S, Bodem, J, Muller, B, Dietrich, U, Werner, J y Krausslich, HG (2005) A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat Struct Mol Biol* 12 671-677
- Svenson, S y Tomalia, DA (2005) Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* 57 2106-2129
- Tang, C, Loeliger, E, Kinde, I, Kyere, S, Mayo, K, Barklis, E, Sun, Y, Huang, M y Summers, MF (2003) Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *J Mol Biol* 327 1013-1020
- Ternois, F, Sticht, J, Duquerroy, S, Krausslich, HG y Rey, FA (2005) The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nat Struct Mol Biol* 12 678-682
- Vitagliano, L, Adinolfi, S, Sica, F, Merlino, A, Zagari, A y Mazzearella, L (1999) A potential allosteric subsite generated by domain swapping in bovine seminal ribonuclease. *J Mol Biol* 293 569-577
- Vogel, M, Schwarze-Zander, C, Wasmuth, JC, Spengler, U, Sauerbruch, T y Rockstroh, JK (2010) The treatment of patients with HIV. *Dtsch Arztebl Int* 107 507-515; quiz 516
- von Schwedler, UK, Stemmler, TL, Klishko, VY, Li, S, Albertine, KH, Davis, DR y Sundquist, WI (1998) Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *EMBO J* 17 1555-1568
- von Schwedler, UK, Stray, KM, Garrus, JE y Sundquist, WI (2003) Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J Virol* 77 5439-5450
- Wilk, T, Gross, I, Gowen, BE, Rutten, T, de Haas, F, Welker, R, Krausslich, HG, Boulanger, P y Fuller, SD (2001) Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75 759-771
- Williams, AJ, Blacklow, SC y Collins, T (1999) The zinc finger-associated SCAN box is a conserved oligomerization domain. *Mol Cell Biol* 19 8526-8535

- Wong, HC, Shin, R y Krishna, NR (2008) Solution structure of a double mutant of the carboxy-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Biochemistry* 47 2289-2297
- Worthylake, DK, Wang, H, Yoo, S, Sundquist, WI y Hill, CP (1999) Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 85-92
- Wright, ER, Schooler, JB, Ding, HJ, Kieffer, C, Fillmore, C, Sundquist, WI y Jensen, GJ (2007) Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *EMBO J* 26 2218-2226
- Yoo, S, Myszka, DG, Yeh, C, McMurray, M, Hill, CP y Sundquist, WI (1997) Molecular recognition in the HIV-1 capsid/cyclophilin A complex. *J Mol Biol* 269 780-795
- Zhang, H, Zhao, Q, Bhattacharya, S, Waheed, AA, Tong, X, Hong, A, Heck, S, Curreli, F, Goger, M, Cowburn, D, *et al* (2008) A cell-penetrating helical peptide as a potential HIV-1 inhibitor. *J Mol Biol* 378 565-580
- Zhou, HX, Rivas, G y Minton, AP (2008) Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu Rev Biophys* 37 375-397
- Zutshi, R, Brickner, M y Chmielewski, J (1998) Inhibiting the assembly of protein-protein interfaces. *Curr Opin Chem Biol* 2 62-66